

~~10-159723~~

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

10-159623
SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No: 10-159623-00000-0000

Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR) CON ACCION
CITOSTATICA Y SUS USOS EN LA TERAPIA DE
TUMORES

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

DOMICILIO: Calle 216 Esq. A 15, Atabey, Playa, Habana,
Ciudad de La Habana, CUBA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

20 DIC. 2010



PETITO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159623- -00000-0000

Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

licación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I



Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CENTRO DE INMUNOLOGIA
MOLECULARDirección: Calle 216 Esq. A 15
Atabey, Playa, Habana
Ciudad de La Habana
CUBANacionalidad o Domicilio: Ciudad de La Habana
Cuba

Lugar de Constitución: CUBA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 756 07 70 Fax: 755 01 58

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

39'779.654 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/CU2009/000004

Fecha

22/06/2009

Publicación Internacional No.

WO 2009/152783 A1

Fecha

23/12/2009

⑥

Título (54)

INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR)
CON ACCION CITOSTATICA Y SUS USOS EN LA TERAPIA DE TUMORES

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/22, A61K 39/395, A61P 35/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

CU

20/06/2008

2008-0117

SI ☒NO ☐

⑨

Comprobante de pago No.

10-107,696 y 10-107,699

Fecha

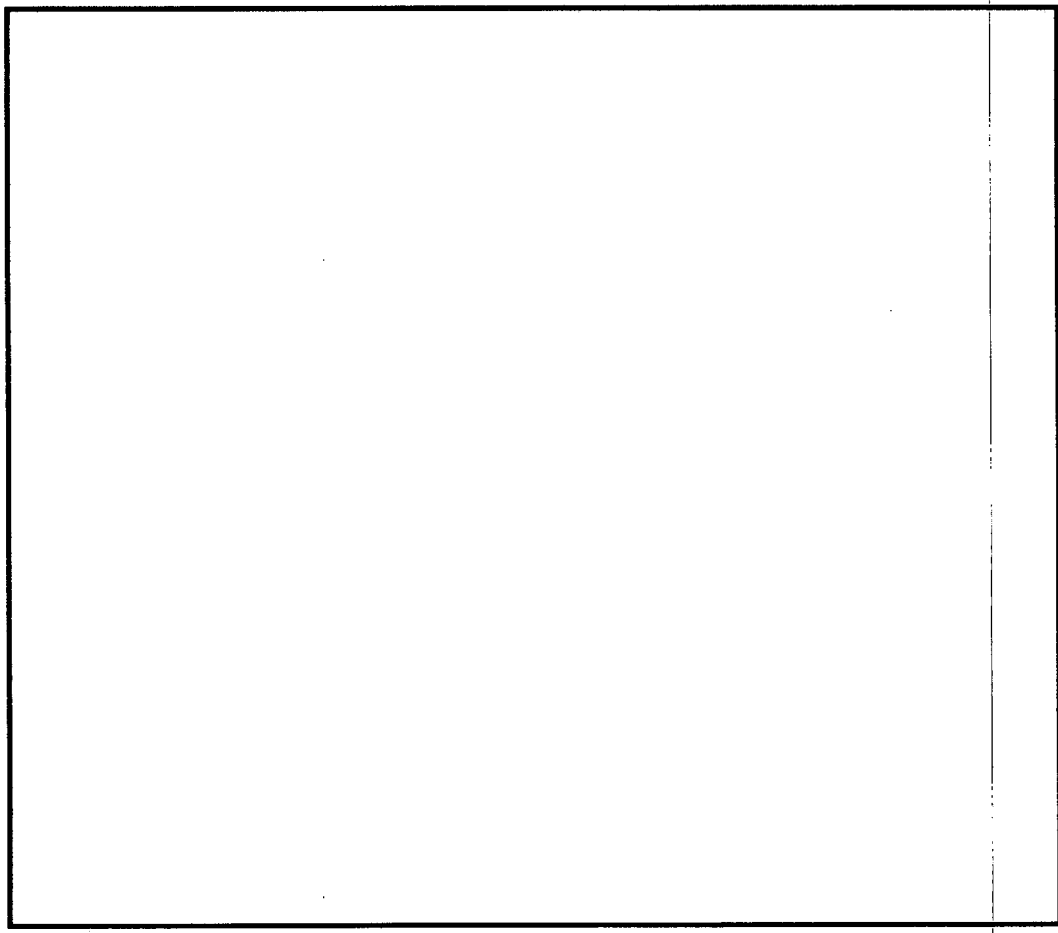
Diciembre 17 de 2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

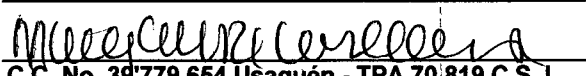
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: 
C.C. No. 39'779.654 Usaquéen - TPA 70.819 C.S.J.

20 DIC. 2010

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ**
Juan Delgado # 567 entre Ave Acosta y O'Farrill
10 de Oct. Habana 10500
La Habana
CUBA
2. **GRETA GARRIDO HIDALGO**
Ave. Camaguey No. 11234 apto. 40 entre Pastora y 13
Casino Deportivo, Cerro
La Habana
CUBA
3. **ERNESTO MORENO FRIAS**
Calle 174, Edif. BBE1, apto. 16, e/1ra y 5ta
Playa, Habana 11600
La Habana
CUBA
4. **JOSE ENRIQUE MONTERO CASIMIRO**
Calle 314 No. 2916 entre 29 y 31
Juan de Dios Fraga, La Lisa, Habana 17 100
La Habana
CUBA
5. **ARIEL TALAVERA PEREZ**
Calle J # 58 entre Calzada y Malecón
Plaza de la Revolución, Habana 10400
La Habana
CUBA
6. **ARLHEE DIAZ MIQUELI**
Avenida 45, No 7414, e/74 y 76
San Antonio de los Baños, Habana 32500
La Habana
CUBA
7. **YILDIAN DIAZ RODRIGUEZ**
Calle 34 # 311 (bajos) entre 3ª y 5ta
Miramar, Playa, Habana 11300
La Habana
CUBA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 107,696
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159623- -00000-0000

Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANDS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387640245	17/12/2010	7,382,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 107,696
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159623- -00000-0000

Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL!
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387640245	17/12/2010	7,382,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 107,699
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-159623-00000-0000

Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387640245	17/12/2010	7,382,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	234,000.00
99	OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	234,000.00
TOTAL :		\$ 234,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

Colombia

PODER

El (los) suscrito (s) Agustín Lage Dávila,
Director del CENTRO DE INMUNOLOGIA
MOLECULAR

domiciliado (s) en Calle 216 Esq. 15, Atabey,
Playa, C. Habana 12100, Cuba.

nombra por el presente a Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. abogadas con oficinas en la Carrera 9ª
No. 93-09, Bogotá - COLOMBIA para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñanzas comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba determinados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 30 de Noviembre de 2000.

en Ciudad de la Habana, Cuba.

Por Agustín Lage Dávila

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

[Signature]

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned _____

of _____

hereby grant(s) Power of Attorney to Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. attorneys residing at Carrera 9ª
No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, specially those, administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments; change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of Court.

Given and signed this _____

in _____

By _____

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. Colombia.

17 DIC 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

Lic. Estrella Díaz Rosmery
Notario



Yo, **LICENCIADA ESTRELLA DIAZ BOSMENIER**. Notaria de la Notaria Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con sede en **GALE Y ASOCIADOS S.A.**, DOY FE que la firma que antecede es la del señor **AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA**, ciudadano cubano, con identidad permanente número 49032207966, y es auténtica por ser la que acostumbra a usar en todos sus actos.

Y para que así conste se expide en la Ciudad de la Habana, a los días 13 del mes diciembre del 2000.



[Handwritten signature]
Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario



Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. Colombia.

17 DIC 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

GENERAL DE CO



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION DE ASUNTOS CONSULARES Y DE
CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR.

José R. Cabañas Rodríguez, /o Manuel Capas
Ruiz, /o Mercedes de Armas García, /o Jesús
Fernández Ponce, /o María Silvia Fernández
Villar, /o Eduardo Valido García.
Funcionarios autorizados para certificar Auto-
rificaciones de firma en Documentos expedidos
para surtir efectos en el extranjero.

... AS AUTENTICA DEL
... ESTE DOCUMENTO.
... SEMEJANZA QUE
... EN ESTE
... ACOSTUMBRA A

EN F. DE
FIRMA Y EL

PRESENTE CON LA
FIRMA.

18 DIC. 2000

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Como Notario Veintiseis del Circulo de
Bogotá, hego constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

17 DIC 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS



Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 1/01

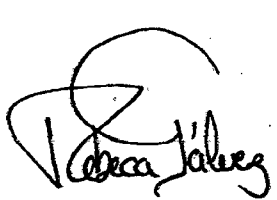
La Habana, Enero 3 del 2001

La suscrita Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que la Señora María Silvia Fernández Villar, quien como funcionaria de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que el CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR es una institución constituida según las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; que Agustín Lage Dávila, quien en su carácter de Director de la citada institución confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.




Vilma Rebeca Gálvez López
Auxiliar Administrativo 5 PA
Encargada de Funciones Consulares

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. - Colombia.

17 DIC 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL

US\$ 7.00 (siete dólares)

DERECHOS FONDO ROTATORIO

US\$ 100.00 (cien dólares)

TOTAL PAGADO

US\$ 107.00 (cientosiete dólares)

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JAN 23 07

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

102503

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Como Notario Veintiseis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

17 DIC 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
 Intelectual
 Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/152783 A1

(43) Fecha de publicación internacional
 23 de diciembre de 2009 (23.12.2009)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
 C07K 16/22 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
 PCT/CU2009/000004
- (22) Fecha de presentación internacional:
 22 de junio de 2009 (22.06.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
 2008-0117 20 de junio de 2008 (20.06.2008) CU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU/CU]; Calle 216 Esq. A 15, Atabey, Playa, Habana, Ciudad de La Habana 11600 (CU).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PÉREZ RODRÍGUEZ, Rolando [CU/CU]; Juan Delgado #567 entre Ave Acosta y O'farrill, 10 de Oct. Habana, Ciudad de la Habana 10500 (CU). GARRIDO HIDALGO, Greta [CU/CU]; Ave. Camaguey No. 11234 apto. 40, entre Pastora y 13., Casino Deportivo, Cerro, Ciudad de la Habana (CU). MORENO FRÍAS, Ernesto [CU/CU]; Calle 174, edif BBE1, apto 16, e/ 1ra y 5ta, Playa, Ciudad de La Habana 11600 (CU). MONTERO CASIMIRO, José Enrique [CU/CU]; Calle 314 No. 2916 entre 29 y 31, Juan de Dios Fraga, La Lisa, Habana, Ciudad de la Habana 17100 (CU). TALAVERA PÉREZ, Ariel [CU/CU]; Calle J # 58 entre Calzada y Malecón, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana 10400 (CU). DÍAZ MIQUELI, Arlhee [CU/CU]; Avenida 45, No. 7414, e/ 74 y 76, San Antonio de los Baños, La Habana 32500

- (CU). DÍAZ RODRÍGUEZ, Yildian [CU/CU]; Calle 34 # 311 (bajos) entre 3a y 5ta., Miramar, Playa., Ciudad de La Habana 11300 (CU).
- (74) Mandatario: MOREJÓN LIMA, Dianelys; Ave. 1ra. esq. 10 # 1001, Miramar, Playa., Ciudad de La Habana 11300 (CU).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: INHIBITORS OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) WITH CYTOSTATIC ACTION AND THEIR USES IN TUMOUR THERAPY

(54) Título: INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) CON ACCIÓN CITOSTÁTICA Y SUS USOS EN LA TERAPIA DE TUMORES

(57) Abstract: The present invention relates to inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) which bond to the receptor by domains I or III blocking the bonding of the natural ligands but which permit physiological equilibrium between the inactive and active conformations of the receptor such as to prevent the mitogenic signal but the fraction of domain II of the receptors in active conformation homodimerise and autophosphorylate the receptor triggering the chain of biochemical events which maintain cell survival. The authors of this invention have found that these inhibitors which recognise the EGFR by domains I or III have a cytostatic and not a cytotoxic effect on tumours which express said receptor and represent an advantage over the state of the art because the adverse effects which they bring about are less significant than those reported.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con inhibidores del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) que se unen al receptor por los dominios I o III bloqueando la unión de los ligandos naturales pero que permiten el equilibrio fisiológico entre las conformaciones inactiva y activa del receptor de tal forma que impiden la señal mitogénica pero la fracción del dominio II de los receptores que están en conformación activa homodimerizan y autofosforilan al receptor desencadenando la cadena de eventos bioquímicos que mantienen la supervivencia de las células. Los autores de esta invención han encontrado que estos inhibidores que reconocen el EGFR por los dominios I o III tienen un efecto citostático y no citotóxico sobre tumores que expresan dicho receptor y representan una ventaja sobre el estado del arte porque los efectos adversos que provocan son menores que los reportados.

WO 2009/152783 A1

5 **Inhibidores del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) con acción citostática y sus usos en la terapia de tumores.**

Campo de la técnica:

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, particularmente con la salud humana. Y más particularmente con nuevos anticuerpos que reconocen el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento Epidérmico (EGF-R) y que bloquean la unión del ligando natural pero sin inhibir completamente la dimerización de esta molécula.

Estado de la técnica anterior:

15 Los avances en el conocimiento de la biología de los tumores y los mecanismos de la oncogénesis han permitido identificar diferentes blancos para la terapia del cáncer, particularmente el cáncer de pulmón, que se sabe es una de las primeras causas de muerte tanto de mujeres como de hombres. Entre estos blancos, el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR),
20 o HER 1 ha recibido particular atención para el tratamiento del cáncer de pulmón. El EGFR es un receptor transmembranario que se encuentra fundamentalmente en células de origen epitelial. La autofosforilación de su dominio intracelular desencadena o inicia una cascada de eventos que conducen a la proliferación celular. El EGFR es comúnmente expresado a altos
25 niveles en una variedad de tumores sólidos y para estos, se ha evidenciado que el EGFR está involucrado en el control de la supervivencia de las células, la proliferación, metástasis y angiogénesis.

La principal estrategia en el desarrollo de armas terapéuticas basadas en la inhibición del EGFR han sido los anticuerpos monoclonales que sean
30 antagonistas de los ligandos naturales del receptor, así como pequeñas moléculas que inhiben la actividad tirosina quinasa del dominio intracelular.

Específicamente contra el HER1 o EGFR existen actualmente varios anticuerpos cuya eficacia terapéutica está siendo evaluada en la clínica. Algunos de ellos son los anticuerpos Cetuximab, Panitumumab y Matuzumab entre otros.

35 Cetuximab (Erbix), es un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce específicamente el dominio extracelular del EGFR y que ha sido aprobado por la FDA para cáncer colo-rectal y tumores avanzados de cabeza y cuello. Resultados experimentales han demostrado que el Cetuximab es un potente inhibidor de la proliferación de las células A431 derivadas de un carcinoma
40 epidermoide, tanto *in vitro* como en tumores trasplantados en ratones atímicos. También se ha demostrado que tienen un efecto sinérgico importante cuando se combinan tanto con drogas citotóxicas como con radioterapia. Estos resultados han servido de base a la realización de ensayos

5 clínicos Los resultados de los Ensayos Clínicos Fase II han demostrado que el
Cetuximab tanto solo como combinado con irinotecan and oxaliplatin tiene
un efecto como terapia de primera línea para pacientes avanzados con
cáncer colo-rectal metastásico, habiéndose reportado un incremento
absoluto de entre el 10 y el 20% de respuesta. Otro ensayo clínico Internacional
10 Multicéntrico que incluyó 424 pacientes con enfermedad loco regional en
estado avanzado, la combinación de Cetuximab con radioterapia
prácticamente dobló el tiempo de sobrevida de los pacientes de 28 a 54
meses. A la vez esta combinación incrementó el tiempo de sobrevida de los
pacientes después de dos y tres años bajo tratamiento desde 55 y 44%
15 respectivamente para los pacientes que recibieron radioterapia solamente
hasta 62 y 57% para aquellos que recibieron la combinación. En general los
resultados han mostrado que el uso del Cetuximab tanto cuando se administra
como mono terapia o en combinación con drogas citotóxicas o con
radioterapia son altamente eficientes. Sin embargo, también se ha observado
20 un significativo incremento de la toxicidad inducida por las terapias
convencionales.

El Panitumumab que es un anticuerpo completamente humanizado que
reconoce el EGFR y es otro anticuerpo monoclonal terapéutico aprobado por
la FDA en 2006 como monoterapia para cáncer colo-rectal metastásico con
25 progresión de la enfermedad después de ser sometidos a régimen de
quimioterapia. Los resultados del tratamiento con Panitumumab son
básicamente similares a los obtenidos con Cetuximab, al igual que las
reacciones adversas.

Se ha evaluado el efecto en la clínica de muchos antagonistas del EGFR,
30 incluyendo diversos anticuerpos monoclonales. Sin embargo la respuesta
objetiva obtenida con la mayoría de estas drogas anti-EGFR ha sido de corta
duración y la toxicidad común ha sido una severa erupción cutánea que en
muchos casos conlleva a la interrupción del tratamiento.

Hasta el momento actual los diferentes ensayos en los que se evalúan drogas
35 relacionadas con el EGFR han arrojado que existe una fuerte asociación entre
la severidad de la erupción cutánea y la respuesta del tumor, lo cual sugiere
que la aparición de la erupción sirve como un marcador predictivo de la
respuesta antitumoral de los agentes que tienen como blanco el EGFR. En otras
palabras, la respuesta de los tumores está asociada al efecto de la droga
40 sobre otros tejidos sanos no relacionados con el tumor, como puede ser la piel
(Peedicayil J. y col., en Correspondence 2004, doi: 10.016).

Gridelli C. y col., en Results of an Experts Panel Meeting, Crit. Rev.
Oncol/Hematol. 2007, doi: 10.1016, hace una revisión de los resultados de.

5 diversos ensayos clínicos en los que se encuentra una relación positiva entre la
erupción cutánea y la respuesta al tratamiento y/o la sobrevida de los
pacientes. En el artículo se concluye que cada vez con más fuerza se
considera la reacción cutánea como un marcador indirecto de que
10 realmente el EGFR está siendo bloqueado por las drogas; por lo que hay casi
un consenso entre los expertos de que la erupción cutánea es un importante
marcador clínico subrogado de la actividad anti tumoral o de eficacia
terapéutica y se sugiere que la reacción cutánea podría servir para identificar
el grupo de pacientes que más se beneficiarían con el tratamiento.

15 Sin embargo, resultados de ensayos clínicos utilizando el anticuerpo
monoclonal anti-EGFR, hR3 (EP 0712863B1 y US 5,891,996), mostraron que el
anticuerpo es bien tolerado por los pacientes. La erupción cutánea, que ha
sido detectada en el 80% de los pacientes tratado con otras drogas
bloqueadoras del EGFR (Perez-Soler y col en Oncologist 2005; 10: 345-56 y
Thomas y col en Clin J. Oncol N 2005; 9: 332-8) no aparece en los pacientes
20 sometidos a dosis repetitivas de hR3 (Crombet y col. en Cancer Biology &
Therapy 5;4, 375-379, 2006).

A pesar del consenso que existe en el estado del arte sobre la asociación
directa entre la erupción cutánea y el bloqueo del EGFR, los autores de la
presente invención consideran que la erupción cutánea es una desventaja
25 asociada a la droga y no al blanco de ahí la necesidad de continuar
explorando nuevos agentes anti-EGFR.

Memoria descriptiva:

La presente invención se relaciona con los inhibidores del receptor de Factor
30 de Crecimiento Epidérmico (EGFR) con actividad citostática y no citotóxica
sobre células que expresan dicho receptor.

Debe entenderse por agente Citostático cualquier agente que inhibe la
proliferación celular deteniendo las células en una fase del ciclo celular;
mientras que agente Citotóxico: es todo agente que induce muerte celular.

35 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que
entre los inhibidores del EGFR, o lo que es igual, aquellas moléculas que en su
interacción con el receptor inhiben la señal mitogénica inducida por los
ligandos naturales, hay un grupo que por el sitio en que reconocen al receptor,
permiten un equilibrio fisiológico entre las conformaciones activa e inactiva del
40 receptor y por tanto mantienen un nivel basal de autofosforilación del
receptor. Este nivel basal de autofosforilación del receptor hace que las
células que lo expresan queden arrestadas en una fase del ciclo celular. La
aplicación clínica de este resultado es que permite el diseño de drogas
antitumorales que mas que inducir la muerte de las células tumorales ejerzan

5 un control biológico sobre el crecimiento del tumor. Adicionalmente, este tipo de droga antitumoral tiene la ventaja que no provoca los serios efectos adversos, como la erupción cutánea, que se ha reportado previamente para los inhibidores del EGFR que tienen efecto citotóxico sobre los tumores.

10 Los inhibidores del EGFR con actividad citostática descritos en la presente invención se podrían caracterizar porque reconocen al EGFR por los dominios I o III de la región extracelular, preferiblemente por dominio III, e inhiben la unión del ligando natural y por tanto la señal mitogénica; aquellas moléculas que reconocen al receptor por estos dominios pero que al mismo tiempo dejan

15 libre el dominio II de la región extracelular del receptor de forma tal que este forme homodímeros que activen la fosforilación de la región intracelular de dichos receptores, resultan moléculas con actividad citostática sobre células que expresan el EGFR y por tanto potenciales agentes terapéuticos para tumores que expresan este receptor de membrana.

20 Los autores de la presente invención también han descubierto que la terapia de tumores malignos con estas moléculas, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que inhiben la señal mitogénica del EGF pero que no impiden un nivel basal de autofosforilación tienen un efecto citostático sobre el crecimiento tumoral.

25 Las armas terapéuticas actuales que tienen como blanco el EGFR, tanto aquellas que resultan antagonistas de los ligandos mitogénicos, como las pequeñas moléculas inhibidoras de la autofosforilación del receptor tienen una utilidad limitada por los efectos adversos que obliga en muchos casos a suspender el tratamiento. Los autores de la presente invención han encontrado moléculas que teniendo como blanco terapéutico el EGFR

30 pueden simultáneamente inhibir el crecimiento tumoral sin producir los severos efectos adversos descritos para los inhibidores de la autofosforilación del EGFR existentes hasta el momento. El hallazgo de la presente invención se basa en inhibir la actividad mitogénica inducida por los ligandos naturales del EGFR sin inhibir completamente la autofosforilación del EGFR. Ha sido descrito

35 previamente que el EGFR se encuentra en equilibrio en la membrana entre sus formas activa e inactiva. Cuando está en forma activa, el dominio II de la región extracelular interactúa con el mismo dominio de otras moléculas formando homodímeros y activando la autofosforilación del dominio intracelular, esta fosforilación desencadena una cascada de eventos vitales

40 para las células. Se ha calculado que en ausencia de ligandos mitogénicos, entre 5 y el 10% de los receptores se encuentran en forma activa y por tanto fosforilados, este nivel de fosforilación aunque no es mitogénico permite la supervivencia de las células. Según los autores de la presente invención, utilizar

5 drogas que inhiban completamente la autofosforilación del receptor
provocaría la muerte celular masiva, tanto las células tumorales como tejidos
normales sufrirán esta privación y de ahí los efectos adversos severos. Sin
embargo con el empleo de los inhibidores que son objeto de la presente
10 invención, se logra inhibir la actividad mitogénica sobre el crecimiento de los
tumores pero se mantiene la fosforilación basal que permite la supervivencia
de las células. El primer tipo de droga provocara un efecto citotóxico con
regresiones tumorales impresionantes pero se le asocian efectos adversos
severos y recaídas tempranas. Las drogas objeto de la presente invención, más
15 que una muerte celular masiva con regresiones espectaculares provocaran
estabilizaciones de la enfermedad por efecto citostático sobre los tumores sin
grandes efectos adversos sobre tejidos normales.

Adicionalmente, los autores de la presente invención también han encontrado
que estos inhibidores de EGFR con actividad citostática mantienen las
propiedades como radio y quimio sensibilizadores descritas previamente para
20 los inhibidores del EGFR con actividad citotóxica.

Basados en los hallazgos experimentales, los autores de la presente invención
reclaman moléculas que tienen como blanco el EGFR y cuya actividad es el
control biológico del crecimiento de los tumores. Tanto cuando son
administrados como monoterapia como cuando se usan en combinación con
25 quimio o radio terapia.

Por tanto son objeto de la presente invención aquellos ligandos del EGFR,
naturales o sintéticos, preferiblemente naturales y más preferiblemente
anticuerpos monoclonales, antagonistas del EGF que inhiben la unión del EGF
al dominio extracelular del receptor pero que no interfieren en la dimerización
30 del receptor y por tanto no afectan el nivel basal de autofosforilación.

Es también objeto de la presente invención un método para el tratamiento de
un paciente de cáncer, que comprende la administración de una
composición farmacéutica que contiene el ligando del EGFR, preferiblemente
un anticuerpo monoclonal, antagonista del EGF pero que no inhibe la
35 autofosforilación basal del receptor.

También forma parte del objeto de la presente invención un método para el
diseño y la selección de los ligandos, preferiblemente los anticuerpos
monoclonales con acción citostática sobre el crecimiento de los tumores
malignos.

40

Descripción detallada de la invención:

El inhibidor del EGFR objeto de la presente invención comprende una
molécula natural o sintética que se una al receptor del Factor de Crecimiento

5 Epidérmico por los dominio I o III de la región extracelular de dicho receptor, preferiblemente por el dominio III, y que se caracteriza porque inhibe la unión del ligando natural y además permite que el receptor adopte la configuración activa. Sorprendentemente, los inhibidores que reconocen al receptor de esta forma tienen un efecto citostático sobre el crecimiento de las
10 células que expresan el receptor a diferencia de los inhibidores descrito hasta el momento de la invención, los cuales tienen un efecto citotóxico sobre dichas células.

E l método para el diseño de los agentes terapéuticos que son objeto de la presente invención se basa en resultados encontrados por los autores de la
15 presente invención y que soportan el modelo de interacción del EGF con su receptor, Estas drogas antagonistas del EGF tienen efecto terapéutico contra el cáncer y resultan con ventajas sobre las drogas antagonistas del EGF previamente descritas. En una representación preferida, estos agentes terapéuticos pueden ser anticuerpos monoclonales contra el EGFR y
20 preferiblemente el anticuerpo monoclonal hR3. Este anticuerpo humanizado se describe con todo detalle en la solicitud de patente EP 0712863B1 y en la patente US 5,891,996, antes mencionadas, y también en diversas publicaciones científicas, por ejemplo en Mateo y col., Immunotechnology 3; 71-81, 1997. En dichos documentos se describen también con todo detalle procedimientos
25 para su obtención.

El modelo de interacción descrito por lo inventores también permite explicar los resultados de ensayos clínicos en pacientes de cáncer donde se evaluó el efecto terapéutico de los agentes objeto de la presente invención.

Es conocido que la interacción del EGF con el dominio extracelular del receptor de membrana induce una cascada de señales que son las que desencadenan la acción mitogénica de este factor de crecimiento. La autofosforilación del dominio intracelular de EGFR es uno de los primeros eventos bioquímicos de esta cascada de señales, pero se sabe que es requisito indispensable la dimerización de los receptores.
30

También es conocido del estado del arte que la molécula de EGF se une simultáneamente a los Dominios I y III de la región extracelular del EGFR, haciendo que el receptor adopte una configuración activa y dejando libre para la dimerización al Dominio II. Los anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen el EGFR y que se han estado probando en la clínica por su efecto
35 terapéutico en tumores son moléculas que funcionan como antagonistas del EGF y se sabe que se unen al receptor inhibiendo la dimerización y la posterior fosforilación. Otros anticuerpos descritos en el arte previo, se sabe que se unen
40

5 directamente al Dominio II del receptor inhibiendo de igual manera la dimerización del receptor.

Sorprendentemente los autores de la presente invención han encontrado que es posible impedir la unión del EGF a su receptor inhibiendo así la señal mitogénica del ligando natural pero al mismo tiempo dejar libre el Dominio II, de forma que no se inhiba la dimerización del receptor, permitiendo de esta manera que ocurra un nivel basal de autofosforilación del mismo.

Es conocido del estado de arte que las moléculas de EGFR se encuentran en la membrana en un equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva. Se dice que entre el 10% y el 5% de los receptores de membrana se encuentran en la conformación extendida que por tanto para esta fracción de los receptores es posible la dimerización con la consiguiente autofosforilación. Si bien este nivel de fosforilación del receptor no constituye una señal para que las células entren en proliferación, al menos permite la viabilidad celular en un estado de quiescencia.

20 Por tanto la utilización de moléculas con las características que se describen en la presente invención sería de gran utilidad en la terapéutica de aquellos tumores que expresen este receptor. El uso terapéutico de las moléculas de la presente invención inhibiría la proliferación de los tumores inducida por el REGF pero al mismo tiempo se evitarían los efectos adversos de los antagonistas del EGF que existen actualmente en la práctica clínica.

De entre los agentes terapéuticos con las propiedades descritas anteriormente resultan preferidos al objeto de la presente invención los anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular del EGFR, siendo especialmente preferido el anticuerpo monoclonal humanizado hR3 descrito previamente en US 5,891,996 y EP 0712863.

Aunque en el estado de la técnica existen agentes terapéuticos que reconocen el mismo blanco, el agente terapéutico de la presente invención tiene características estructurales y funcionales que le dan ventajas desde el punto de vista terapéutico sobre los que han sido descritos previamente. Una de las particularidades del anticuerpo de la presente invención son aquellas observadas en la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento y unión del antígeno.

Adicionalmente, el objeto de la presente invención se relaciona con un método para inhibir el crecimiento de tumores dependientes del EGF, caracterizado porque la administración en dosis terapéuticas del agente terapéutico provoca la estabilización de la enfermedad más que la regresión drástica del tamaño tumoral.

5 También son objeto de la presente invención composiciones terapéuticas que comprenden una disolución acuosa de al menos uno de estos inhibidores citostáticos útiles en el tratamiento de tumores u otras patologías asociadas a la desregulación del EGFR. En las composiciones farmacéuticas de la presente invención la concentración del inhibidor, particularmente el anticuerpo esta
10 en un rango de 10-200 mg/ml y más particularmente, esta concentración estar en el rango de 50-150 mg/ml.

Adicionalmente, la presente invención comprende el uso de estos inhibidores del EGFR, particularmente el anticuerpo monoclonal humanizado hR3 (Nimotuzumab) en combinación con radioterapia u otros agentes terapéuticos
15 tales como agentes quimioterapéuticos o la combinación de estos para el tratamiento de tumores malignos. Según la presente invención, la administración del inhibidor objeto de la presente invención puede ser oral, parenteral (intravenoso o intramuscular), tópico, transdérmico o por inhalación. Es otro de los objetos de la presente invención un método para la selección de
20 inhibidores del EGFR con actividad citostática. Dicho método se basa fundamentalmente en la medición del contenido de ADN de las células por incorporación de yoduro de propidio en células permeabilizadas y fijadas, tal como se describe en el ejemplo 6 de la presente invención. .

25 EJEMPLOS;

Ejemplo 1: Estructura del Cristal del fragmento Fab del hR3.

La estructura del cristal del fragmento Fab del anticuerpo hR3 se determinó a una resolución de 2.5 Å y se refinó para los factores R con buena estéreo química.

30 En general la estructura del cristal es similar a las estructuras de otros fragmentos Fab. Sin embargo se encontró un rasgo peculiar y es que el CDR 1 de la cadena pesada no se ajusta a ninguna de las conformaciones canónicas descritas. Por el contrario, se encontró que esta región adopta una estructura de alfa hélice. Esta conformación de alfa hélice no pertenece a
35 ninguna de las conformaciones canónicas descritas para el CDR 1 de las cadenas pesadas, en la Figura 1 se representa la estructura del cristal de fragmento Fab donde se puede apreciar la peculiaridad en la estructura del CDR1 de cadena pesada.

Por un método semi automático se comparó la estructura del cristal del
40 fragmento Fab del anticuerpo hR3 con las estructuras de cristales de fragmentos similares contenidos en la base de datos PDB actualizada hasta Mayo de 2007. En la base de datos se encontró que solamente otro anticuerpo

5 humanizado por el método de trasplante de los CDR tenía este rasgo peculiar en la estructura del CDR1 de la cadena pesada.

Ejemplo 2: Estudio de la unión del fragmento al ligando.

10 Mediante estudios de Biacore se determinó que los fragmentos Fab del anticuerpo hR3 se unen al dominio extracelular del EGFR con una K_D de 2.0×10^{-8} M, en dicho estudio se usó como control el fragmento Fab del anticuerpo comercial contra el EGFR Cetuximab para el cual se encontró que se une al dominio extracelular del receptor con un K_D de 1.9×10^{-9} M, similar al valor reportado previamente.

15 Como se observa el anticuerpo hR3 tiene una afinidad menor que el Cetuximab, esto es debido fundamentalmente a que tiene una mayor K_{on} .

Estas diferencias en la afinidad de ambos receptores podría explicar la diferencia de su efecto biológico, particularmente efectos adversos, cuando es usado en tratamientos sistémicos en pacientes de cáncer.

20

Fab	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_d (M)
Nimotuzumab	5.2×10^4	1.1×10^{-3}	2.1×10^{-8}
Cetuximab	3.1×10^6	5.8×10^{-3}	1.8×10^{-9}

TABLA 1:

Adicionalmente, se comprobó que el hR3 competía por la unión al EGFR con el anticuerpo Cetuximab. Empleando técnicas de ELISA se hicieron ensayos de inhibición con el anticuerpo Cetuximab que se sabe por la literatura que se une de manera específica y exclusiva al Dominio III del EGFR. Para esto se usaron placas recubiertas con EGFR y se mantuvo constante la concentración del fragmento Fab-hR3 biotinilado. Se usaron diluciones del fragmento Fab-Cetuximab y se observó como la señal dada por el Fab-hR3 biotinilado, al ser revelado con estreptavidina conjugada a fosfatasa, disminuía.

30 También se realizaron ensayos de competencia utilizando el FACS sobre células A431, que se conoce que sobre expresan el EGFR. Aquí se hicieron diluciones de hR3/Cetuximab similares a las descritas anteriormente y se confirmó que el anticuerpo hR3 compite con el Cetuximab por la unión al receptor de EGF.

35 Los resultados obtenidos tanto por ELISA como por FACS indican que los epitopos reconocidos por ambos anticuerpos están muy cercanos y no es posible que ambos se unan simultáneamente al receptor. Basándose en estos resultados y conociendo del arte previo que Cetuximab se une al EGFR por el

- 5 dominio III de la región extracelular del receptor, es posible asumir que el hR3 se une al EGFR por el mismo Dominio que el Cetuximab.

Ejemplo 3: Modelo del complejo anticuerpo-receptor.

10 El modelo del complejo entre hR3 y el EGFR se predijo mediante cálculos "in silico". Para esto se usaron, de forma secuencial, el programa RosettaDock, para la predicción del acoplamiento de ambas proteínas y Posteriormente se usó el programa NAMD para relajar la estructura del complejo dentro de una caja de agua.

15 El resultado de este modelo se observa en la Figura 1. El panel A) muestra una vista general del modelo con el EGFR en su conformación de baja afinidad de unión al ligando (inactiva). En el panel B) se observa igualmente una vista general del modelo pero en este caso el EGFR está en su conformación de alta afinidad por el ligando (activa). De esta figura se observa que según
20 nuestro modelo hR3 es capaz de unirse al EGFR sin inhibir el cambio de conformación que este necesita para la dimerización y la posterior señalización. El panel C) muestra un acercamiento a las interacciones moleculares entre el hR3 y el EGFR.

En la Figura 2A se muestra como, según nuestro modelo, inhibe la unión del Cetuximab. Mientras en la Figura 2B, se muestra como el anticuerpo hR3
25 bloquea la unión del ligando EGF a su receptor el EGFR.

Ejemplo 4: Modelo teórico de un fragmento Fv de un anticuerpo que se une al dominio I del EGFR.

30 El modelo se obtuvo por la misma metodología que el modelo del ejemplo 3. El anticuerpo unido permite que el receptor adopte la conformación activa donde los dominios I y II están próximos uno al otro. El EGF (Figura 3, en rojo, representado en modelo de Dreiding), en cambio, no puede colocarse en su sitio de unión debido a impedimentos estéricos causados por el anticuerpo (el solapamiento de ambas estructuras es claramente visible en la Figura 3. La estructura del EGFR en complejo con el EGF fue tomada del
35 fichero con código 1ivo del Protein Data Bank. El fragmento Fv de anticuerpo fue construido por modelación computacional.

Ejemplo 5: Efecto citotóxico de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR sobre las células tumorales A431 y H125.

40 Las células A431 y H125 (2×10^5) se sembraron en placas de 24 pozos usando medio DMEN:F12 al 10% SFT. Doce horas después las células se tratan con los anticuerpos monoclonales Cetuximab (7-175 nM) o Nimotuzumab (70-1750 nM) en medio DMEN:F12 con 1% de SFT y EGF humano (500 pg/ml) y se incubaron

5 48 horas. Este tratamiento se repitió durante otras 48 horas. La muerte celular se analizó después de 96 horas de tratamiento mediante citometría de flujo utilizando un marcaje con yoduro de propidio (10 µg/ml). Las células no tratadas se incluyeron como control de mínima muerte. En las dos líneas celulares analizadas, el Cetuximab induce mayor porcentaje de células
10 muertas a todas las concentraciones ensayadas que el anticuerpo Nimotuzumab (Figura 4). Es de resaltar que este resultado se obtiene aun cuando el Nimotuzumab es usado 10X de concentración con respecto al Cetuximab, para independizar las diferencias en efecto citotóxico de las diferencias en afinidad de ambos anticuerpos.

15

Ejemplo 6: Efecto citotóxico versus citostático de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR sobre las células tumorales A431 y H125.

Las células A431 y H125 (0.25×10^6) se sembraron en placas de 6 pozos usando medio DMEN:F12 al 10% SFT. Doce horas después las células se tratan con los
20 anticuerpos monoclonales Cetuximab o Nimotuzumab (7-1750 nM) o con el AG1478 (inhibidor tirosina cinasa del EGFR) a 10 µM en medio DMEN:F12 con 1% de SFT y EGF humano (500 pg/ml) y se incubaron 48 horas. Este tratamiento se repitió durante otras 48 horas. Para analizar el ciclo celular y la fragmentación del ADN (marcador de apoptosis tardía) en estas líneas después de las 96
25 horas de tratamiento, las células se fijaron con una mezcla de metanol:acetona (4:1) a 4°C y se marcaron incubando con yoduro de propidio (400 µg/ml) y RNAsa (100 µg/ml). Ambos análisis se realizaron en un citómetro de flujo, colectando como mínimo 20 000 eventos y los datos se procesaron usando los programas WinMDI 2.8 y ModFit3.0.

30 Como se puede observar en la Figura 5, tanto en las células A431 (A) como en las H125 (B) ambos anticuerpos monoclonales (Cetuximab: 175 nM, Nimotuzumab: 1750 nM) inducen un similar incremento en la fracción de las células en la fase G0-G1 con la correspondiente disminución de las células en las fases G2-M y S al compararse con las células sin tratamiento. Este efecto fue
35 comparable al obtenido con el AG1478 usado como control positivo de detención del ciclo celular. En las tablas 1 (A431) y 2 (H125) se muestran los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo para un amplio rango de concentraciones de Nimotuzumab y Cetuximab que se emplearon para hacer el experimento.

40 Sin embargo, cuando se analiza la capacidad de estos anticuerpos de inducir apoptosis sobre estas células, se observa que aun cuando ambos son capaces de tener un semejante efecto anti-proliferativo sobre las células A431 y H125, el Cetuximab induce a todas las concentraciones empleadas un mayor

5 porcentaje de células apoptóticas que el Nimotuzumab (Figura 5, Tabla 2, Tabla 3).

Fases del ciclo celular (%)	Sin tratamiento	Cetuximab (nM)				
		7	35	70	140	175
G ₀ /G ₁	46.21	56.57	58.08	62.19	64.87	70.89
G2/M	8.89	8.01	8.04	7.46	6.09	5.03
S	44.90	35.42	33.88	30.35	29.04	24.08
Células apoptóticas(%)	3.50	3.96	10.78	19.67	25.45	31.19

Fases del ciclo celular (%)	AG1478 10 µM	Nimotuzumab (nM)				
		70	350	700	1400	1750
G ₀ /G ₁	79.82	56.08	58.98	60.32	64.68	70.01
G2/M	3.11	8.12	7.87	7.98	6.21	5.12
S	17.06	35.08	33.17	31.7	29.11	24.87
Células apoptóticas(%)	42.75	3.62	3.94	4.07	4.65	5.50

10 **Tabla 2.** Distribución del ciclo celular y porcentaje de células apoptóticas de la línea A431 tratada con diferentes concentraciones de Cetuximab y Nimotuzumab.

Fases del ciclo celular (%)	Sin tratamiento	Cetuximab (nM)				
		7	35	70	140	175
G ₀ /G ₁	50.68	51.41	55.22	57.69	60.69	69.46
G2/M	10.25	10.02	9.56	9.34	9.22	9.05
S	39.07	38.57	35.22	33.27	30.09	21.54
Células apoptóticas (%)	7.18	10.35	16.62	20.15	23.59	25.48

Faese del ciclo celular (%)	AG1478 10 µM	Nimotuzumab (nM)				
		70	350	700	1400	1750
G ₀ /G ₁	74.55	53.89	54.63	55.52	58.34	68.55
G2/M	8.79	11.45	9.89	9.68	9.46	9.28
S	16.66	34.66	35.48	34.80	32.20	22.17
Células apoptóticas (%)	31.67	7.24	8.30	10.63	11.40	13.67

15 **Tabla 3.** Distribución del ciclo celular y porcentaje de células apoptóticas de la línea H125 tratada con diferentes concentraciones de Cetuximab y Nimotuzumab.

Ejemplo 7: Actividad antitumoral en ratones afímicos xenotrasplantados.

20 Los animales utilizados para la experimentación fueron ratones afímicos NMRI (8-10 semanas) los cuales se obtuvieron de Charles River (Sulzfeld, Alemania).

5 Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas en un animalario aprobado en el cuidado de animales de laboratorio y acorde a las regulaciones y normas vigentes, y su uso fue aprobado por las autoridades responsables locales.

Para producir los tumores, las células se tomaron de cultivos subconfluentes por

10 tratamiento con tripsina 0.25% y EDTA 0.05%. La trypsinización se detuvo con medio al 10% de suero fetal de ternera. Para la inoculación solo se emplearon aquellas suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 90%. Se

15 inocularon 8 animales por grupo con 10^7 células de la línea U87MG por vía subcutánea en el flanco izquierdo y con 2×10^4 U87MG por vía intracraneal en el hemisferio derecho del cerebro de los ratones con la ayuda de un

20 dispositivo estereotáctico. El peso corporal de los ratones se monitoreó durante toda la experimentación. La talla de los tumores subcutáneos se midió tres veces por semana y el volumen tumoral se determinó mediante la fórmula: $0.5 \times (\text{diámetro mayor}) \times (\text{diámetro menor})^2$. Los índices de volumen tumoral

relativos (RTV) se calcularon referidos a los volúmenes medios de cada día respecto a la primera medición (ajustado a 1). Los animales se sacrificaron

25 cuando el peso de los tumores excedió el 10% del peso total de los animales. La talla de los tumores intracraneales también se determinó. Para ese propósito se extrajeron los cerebros completos de los animales y se congelaron en 2-metil

butano. Se realizaron cortes en criostato (10 μ m) y se tomaron secciones consecutivas y se tiñeron con violeta cresil. Se determinaron los diámetros

30 mayores de los tumores y los perímetros con la ayuda de un microscopio (Zeiss Axioskop), y se calcularon los volúmenes tumorales. Los tumores subcutáneos se congelaron y se almacenaron a -80°C para otros análisis. Los diferentes

tratamientos se iniciaron tres días después de inoculados los tumores. Los

35 animales se trataron tres veces por semana con los anticuerpos monoclonales Nimotuzumab o Cetuximab con 50 mg/kg/dosis mediante administración intraperitoneal. En los grupos que recibieron irradiación, los animales se

expusieron a una dosis total de 3.0 Gy de irradiación de cuerpo completo (TBI),

40 fraccionado en 1.0 Gy semanal durante tres semanas comenzando 72 horas después de la inoculación de los tumores. Además se trataron grupos de

animales con la combinación de los anticuerpos más la radioterapia. En estos

grupos los anticuerpos se administraron 6 horas antes de la terapia de

radiación. En el experimento se incluyó un grupo adicional de 10 animales que

recibió solución salina en lugar de anticuerpos y se tomó como control. Figura

6 muestra la sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada por vía subcutánea en ratones NMRI atímicos por anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los anticuerpos se administraron por vía

5 intraperitoneal a 50 mg/kg/dosis tres veces por semana durante tres semanas. Los animales tratados con radioterapia recibieron una dosis total de 3 Gy fraccionada en 1 Gy semanal durante tres semanas. En la figura se muestran las administraciones de los anticuerpos en flechas negras continuas y la radiación en flechas fraccionadas. Los volúmenes tumorales se determinaron en los

10 tiempos indicados. La adición de los anticuerpos a la radioterapia retardó significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de los tumores en los ratones respecto a los grupos de animales tratados con radioterapia o no tratados. La adición del Nimotuzumab a la radioterapia también retardó significativamente el crecimiento de los tumores respecto al grupo tratado con el anticuerpo

15 solamente. Prueba estadística de Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias estadísticas respecto a (*) PBS, (+) anticuerpo solo, (°) radioterapia. Figura 7 muestra la sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada ortotópicamente en ratones NMRI atímicos a la radioterapia por anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Todos los tratamientos comenzaron tres días después de la inoculación de los tumores con Nimotuzumab, Cetuximab, radioterapia, Nimotuzumab más radioterapia, Cetuximab más radioterapia o PBS. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a 50

20 mg/kg/dosis tres veces por semana durante tres semanas. Los animales tratados con radioterapia recibieron una dosis total de 3 Gy fraccionada en 1 Gy semanal durante tres semanas. Las secciones de cerebro analizadas en los grupos que recibieron los anticuerpos más la radioterapia mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en el tamaño de los tumores. La adición del Nimotuzumab a la radioterapia disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el tamaño de los tumores respecto a la radioterapia sola. Prueba estadística de

25 Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias significativas respecto a: (*) PBS, (+) radioterapia.

35 **Angiogenesis (CD31/PECAM-1).** Las muestras de tumores se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se fijaron en para-formaldehído 3.7% durante 15 minutos. Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0.03% (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) durante 15 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario anti CD31/PECAM-1 a temperatura ambiente por 2 horas a una dilución de 1:100 en medio diluyente de anticuerpo (DAKO Corporation, Carpinteria, CA).

40 Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa a temperatura ambiente durante 30 minutos para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. Finalmente se visualizaron las secciones con el cromógeno DAB (DAKO Corporation, Carpinteria, CA), se

5 montaron las láminas y se analizó la tinción con CD31. Las secciones tumorales representativas se visualizaron en un microscopio de luz (Zeiss, Axioskop) con una magnificación ocular de X40. Se estimó el área de los micro-vasos sanguíneos endoteliales presentes en los tumores de 5 campos microscópicos en cada tumor, y se promedió el valor medio en cada caso. El área total de
10 los vasos evaluados se calculó empleando el programa Axio Vision 4.5 (Zeiss). El tratamiento con Nimotuzumab estuvo asociado a una significativa reducción ($p < 0.01$) en el área de los vasos de los animales tratados (Figura 8).

CD133. Para la determinación de la expresión de CD133 las muestras tumorales se fijaron en acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15 Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en peróxido de hidrógeno 0.03% (DAKO Corporation, Carpinteria CA) durante 30 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero fetal de ternera al 20% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-CD133/1 AC133
20 (Miltenyi Biotec) durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de trabajo de 1:10 en diluyente de anticuerpo. Posteriormente se lavaron las muestras y se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se visualizaron las secciones con el cromógeno DAB (DAKO Corporation, Carpinteria, CA), se montaron las láminas
25 y se analizó la tinción con CD133. Las secciones tumorales representativas se visualizaron en un microscopio de luz (Olympus, Japan) con una magnificación ocular de X40. El porcentaje de células positivas al CD133 se determinó promediando el número de células positivas al marcador para cada grupo analizado en las secciones correspondientes a los 5 campos donde se observó
30 la mayor tinción. Figura 9 muestra el análisis inmunohistoquímico de la expresión del CD31 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados. El tratamiento con Nimotuzumab estuvo asociado a una significativa reducción ($p < 0.05$) en el porcentaje de células CD133 positivas respecto a los animales tratados con radioterapia. La adición
35 del Nimotuzumab a la radioterapia disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de células CD133 positivas respecto a los animales tratados con radioterapia y respecto a los animales no tratados. Prueba estadística de Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias significativas respecto a: (*) PBS, (+) radioterapia.

40 **Análisis Estadístico.** Las medias, desviaciones estándar, y el error estándar de la media se calcularon utilizando el programa GraphPAD versión 4.0 (GraphPAD, San Diego, C.A.). El análisis estadístico se realizó con el mismo programa GraphPAD InStat. La significación estadística entre grupos se comparó

- 5 utilizando la prueba de Mann-Whitney, y la prueba de comparación Múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$.

Ejemplo 8: Efecto antitumoral de la combinación del Anticuerpo monoclonal hR3 (Nimotuzumab) y Carboplatino a bajas dosis. Los animales utilizados para la experimentación fueron ratones atímicos NMRI (8-10 semanas) retados por vía subcutánea con un tumor de origen humano clasificado como NSCLC. El día 0 del experimento los animales fueron inoculados con fragmentos del tumor. Cuando los tumores fueron palpables (entro los 10 y 12 días post-inoculación del tumor) los animales fueron tratados con 50 mg/Kg del anticuerpo monoclonal hR3 tres veces por semana y/o una dosis semanal de Carboplatino a 50 mg/Kg durante 6 semanas por vía intraperitoneal. Se usó PBS como control del experimento. El diámetro tumoral mayor y menor de los tumores fueron medidos 2 veces por semana y el volumen tumoral calculado por la siguiente fórmula: $VT = (\text{diámetro menor})^2 \times \text{diámetro mayor} / 0.52$. El Volumen Tumoral Relativo fue calculado de la siguiente manera: $VT \times 1 / VT_{\text{dia 0}}$. En la gráfica se representa el volumen tumoral relativo con el error estándar de la media. Figura 10.

Breve descripción de las figuras:

25 **Figura 1:** Vista general del modelo (representado n modelo de cintas, eEGFR en azul, VL y VH en carmelita y verde respectivamente. A) EGFR en su conformación de inactiva (baja afinidad) y B) EGFR en su conformación activa (alta afinidad). C) acercamiento a la interfase de interacción entre el Nimotuzumab y el EGFR.

30 **Figura 2:** Inhibición de la unión del Cetuximab A) y EGF, B) por el Nimotuzumab.

35 En A) Utilizando la representación de cintas se muestra el Cetuximab y por cintas y superficie está representado el Nimotuzumab (VL y VH de carmelita y verde respectivamente) y el EGFR en su conformación inactiva en azul. En B) se muestra el EGF como representación de cintas y superficie en color rojo.

Figura 3: Modelo teórico de un fragmento Fv de anticuerpo (en verde, representado en modelo de cintas) que se une al dominio I del EGFR.

40 **Figure 4.** Cetuximab tiene una mayor capacidad citotóxica que Nimotuzumab en las células A431 y H125. Las células A431 y H125 se trataron con los anticuerpos cetuximab (7-175 nM) o Nimotuzumab (70-1750 nM) durante 96

5 horas y posteriormente se tiñeron con IP analizándose por FACS. Cada barra representa la media del porciento de células muertas a partir de células totales $\pm$ D.E de 3 pozos de tratamiento. Estos experimentos se repitieron tres veces obteniéndose resultados similares.

10 **Figure 5.** Nimotuzumab y Cetuximab tienen un similar efecto citostático sobre las células A431 y H125 mientras Cetuximab induce una mayor respuesta apoptótica que el Nimotuzumab sobre estas células. Las células A431 (A) y H125 (B) se trataron con los anticuerpos cetuximab (175 nM), nimotuzumab (1750 nM) o el AG1478 (10 μ M) durante 96 horas y posteriormente se tiñeron
15 con IP analizándose por FACS. En cada gráfico se muestran dos regiones. La de línea discontinua corresponde a las células vivas y para las mismas se muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo. La de línea continua corresponde a las células apoptóticas y el porcentaje de las mismas con respecto al total también se muestra. Estos experimentos se repitieron tres
20 veces obteniéndose resultados similares.

Figura 6: Sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada por vía subcutánea en ratones NMRI atímicos por anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Todos los tratamientos comenzaron tres días después de la
25 inoculación de los tumores con $\circ$ Nimotuzumab (h-R3), Δ Cetuximab (C225), $\blacksquare$ radioterapia (RT), $\bullet$ Nimotuzumab más radioterapia (h-R3 + RT), $\blacktriangle$ Cetuximab más radioterapia (C225 + RT) $\square$ PBS como control (PBS).

Figura 7: Sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada ortotópicamente en ratones NMRI atímicos a la radioterapia por anticuerpos monoclonales anti-EGFR.
30

Figura 8: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CD31 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados con
35 Nimotuzumab (h-R3), Cetuximab (C225), radioterapia (RT), Nimotuzumab más radioterapia (h-R3 + RT), C225 más radioterapia (C225 + RT), o PBS.

Figura 9: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CD133 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados con
40 Nimotuzumab (h-R3), radioterapia (RT), Nimotuzumab más radioterapia (h-R3 + RT), o PBS.

5 **Figura 10:** Efecto antitumoral de la combinación del Anticuerpo monoclonal
hR3 (Nimotuzumab) y Carboplatino a bajas dosis. Animales atímicos retados
con un tumor de origen humano clasificado como NSCLC, fueron tratados con
3 dosis diarias de 50 mg/Kg del anticuerpo hR3 y una dosis semanal de
10 Carboplatino a 50 mg/Kg durante 6 semanas. En la gráfica se representa el
volumen tumoral relativo con el error estándar de la media.

15
20
25
30
35
40

5

Reivindicaciones

1. Un inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) caracterizado porque dicho inhibidor reconoce al EGFR por los dominios I o III de la región extracelular inhibiendo la unión de los ligandos mitogénicos, adicionalmente permite que el dominio II de la región extracelular del receptor forme homodímeros que activen la autofosforilación de modo tal que dicho inhibidor tiene una actividad citostática sobre células que expresan el receptor.
2. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio I de la región extracelular.
3. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio III de la región extracelular.
4. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.
5. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 4 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal humanizado o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.
6. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho inhibidor es el anticuerpo humanizado hR3 producido por el hibridoma secretor con numero de Depósito ECACC 951110101, o sus fragmentos con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.
7. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 4.
8. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 6 con numero de Depósito ECACC 951110101.
9. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los inhibidores de las reivindicaciones 1 a 3, y que adicionalmente puede contener excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente activos.
10. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos del anticuerpo de las reivindicaciones 4 a 6, y que adicionalmente puede contener

- 5 excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente
 activos.
- 10 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, caracterizada
 porque comprende el anticuerpo humanizado o los fragmentos del
 anticuerpo producido por el hibridoma secretor con numero de
 Deposito ECACC 951110101, o alguna de sus variantes o fragmentos
 con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.
12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el
 anticuerpo humanizado o los fragmentos del anticuerpo de la
 reivindicación 6.
- 15 13. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 para la terapia de tumores
 malignos.
14. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con
 radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
- 20 15. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con
 quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
16. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 para la terapia de tumores
 malignos.
17. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 en combinación con
 radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
- 25 18. Uso del inhibidor de la reivindicación 6 en combinación con
 quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
19. Un método para la selección de los inhibidores de la reivindicación 1.

30

35

40

Figure 1

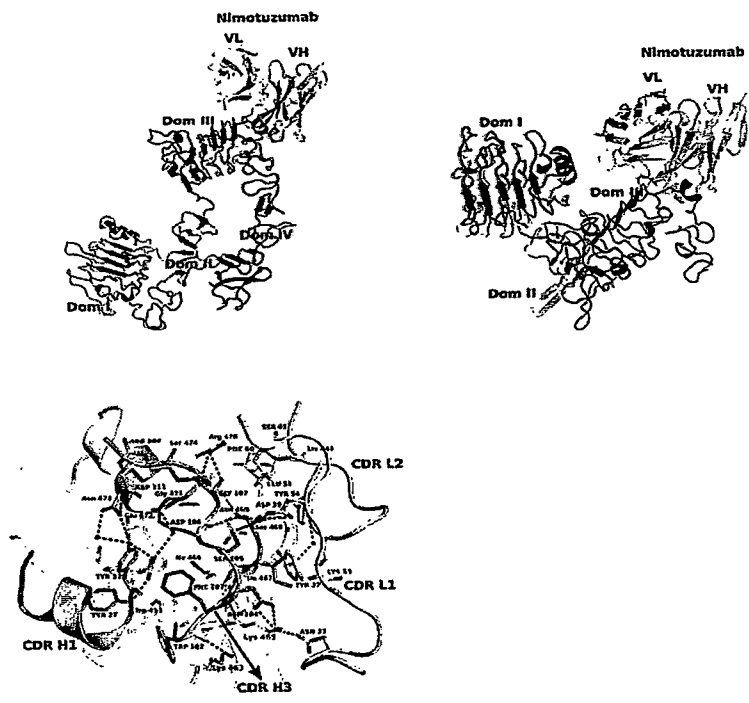
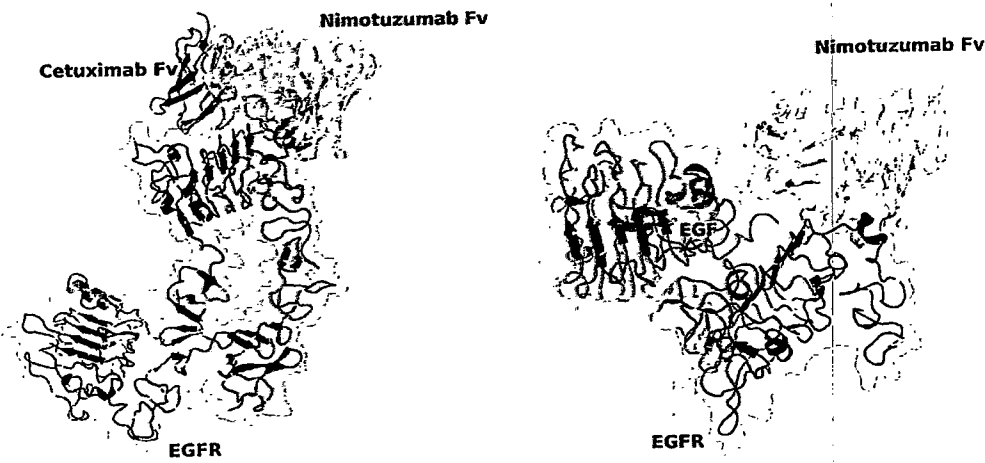
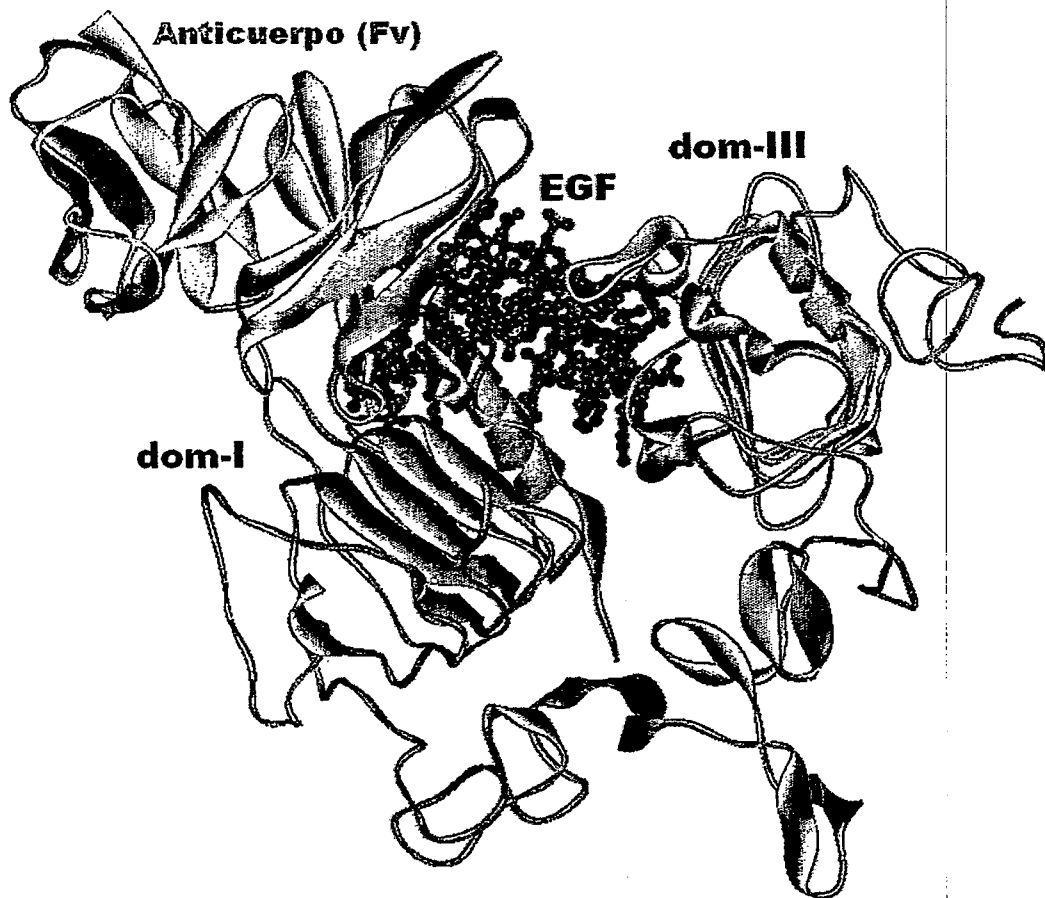


Figura 2



3/10

Figure 3



4/10

Figure 4

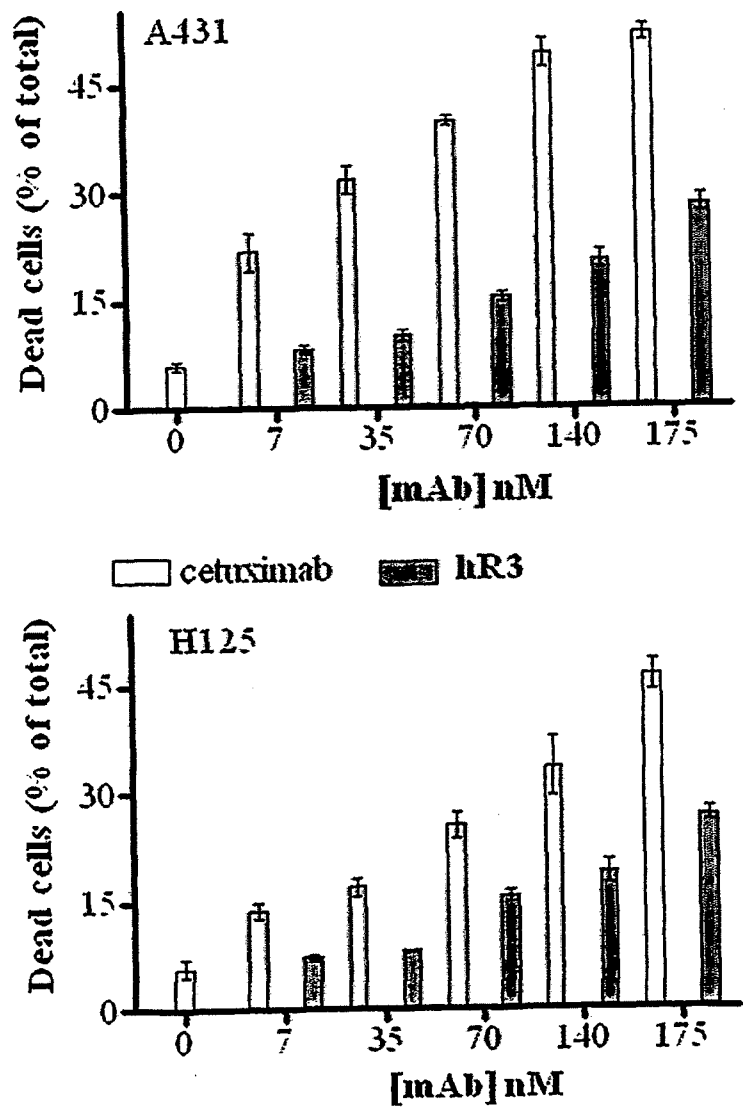
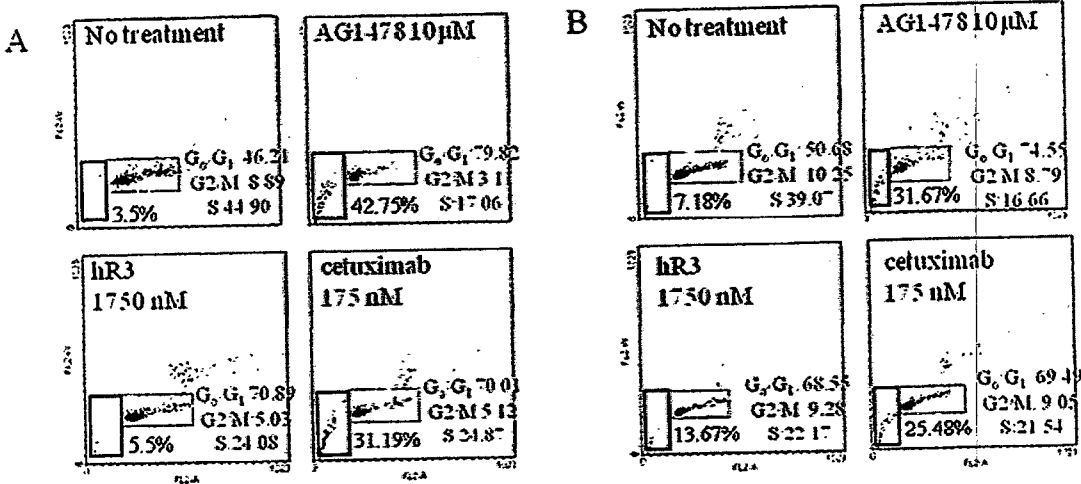
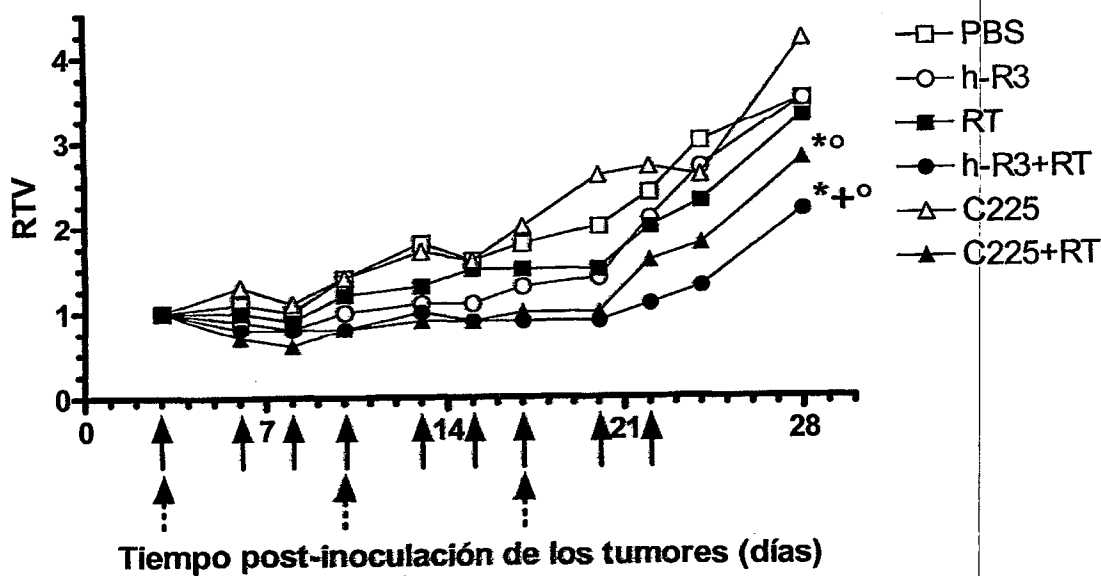


Figure 5



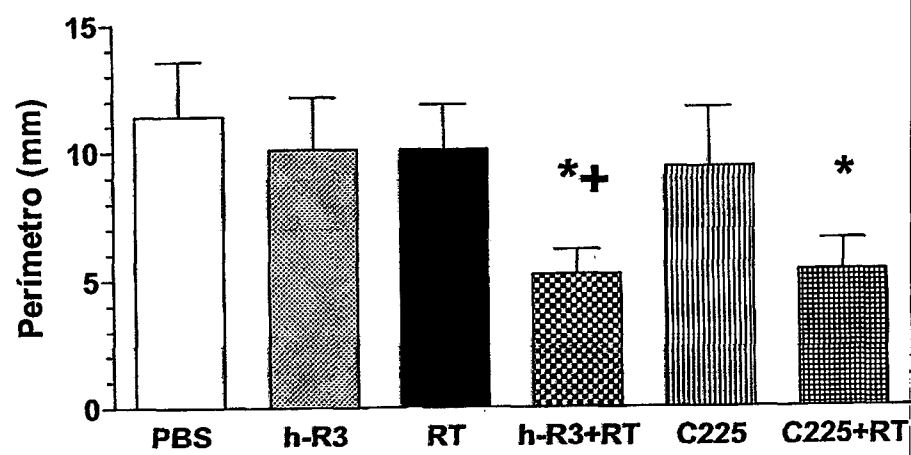
6/10

Figure 6



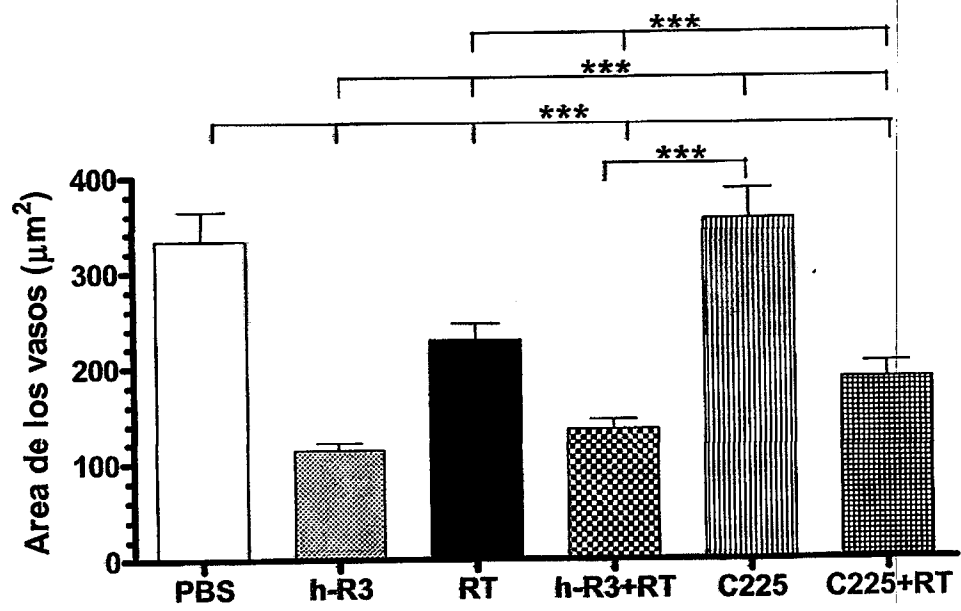
7/10

Figure 7



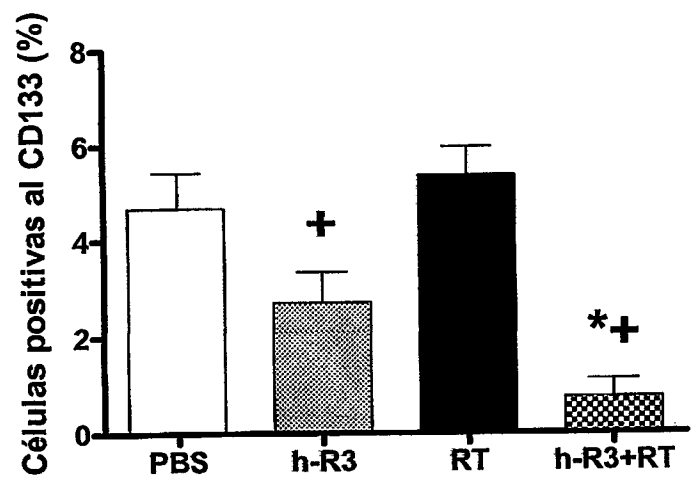
8/10

Figure 8



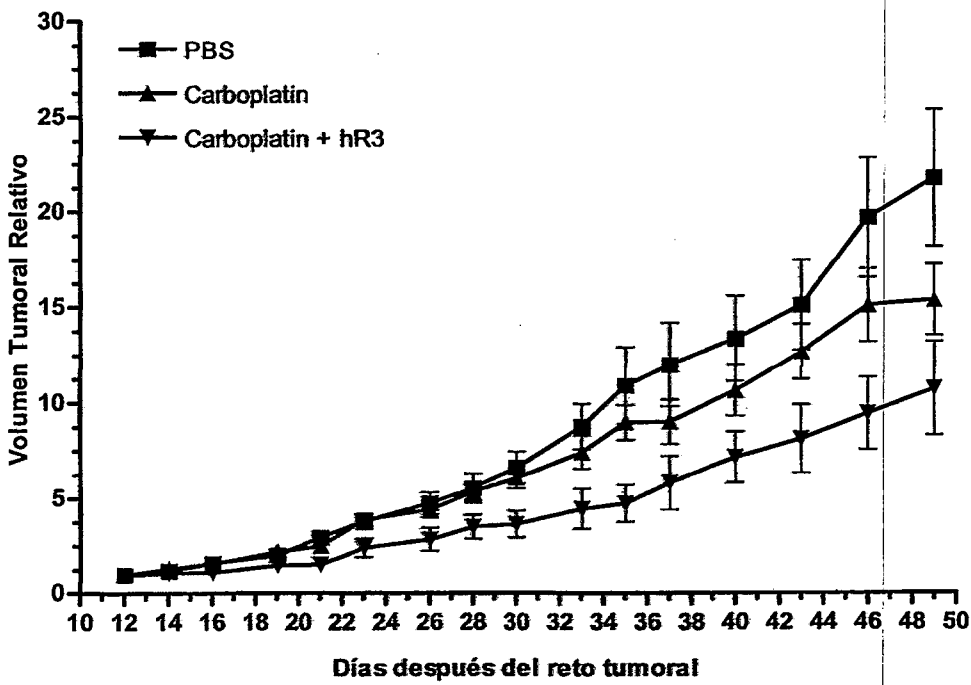
9/10

Figure 9



10/10

Figure 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2009/000004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0065398 A1 (Del Río et al.) 30.05.2002, paragraphs [1-35]; paragraphs [47-75]; paragraphs [136-137]; claims 1,9-12; claims 15-24;	6, 8, 10, 11 y 16
X	TheraCIM. h-R3. Drugs of the Future. 2003, Vol. 28, Nº 9, pages 847-853. CCC: 0377-8282/2003 (the whole document).	6, 8, 10, 11 y 16
X	Crombet-Ramos T. et al. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: a humanized anti-EGFR antibody. Int. J. Cancer. 2002, Vol. 101, pages 567-575. DOI: 10.1002/ijc.10647 (the whole document).	6, 8, 10, 11 y 16
X	WO 2008/037225 A1 (CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR) 03.04.2008, (the whole document).	6, 8, 10, 11, 16 y 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 2009 (30.09.2009)

Date of mailing of the international search report

(09/10/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Cumbreño Galindo

Telephone No. +34 91 349 68 80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU 2009/000004

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Soriano J. et al. Phase I clinical study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody (Nimotuzumab) in combination with chemotherapy in patients with locally-advanced breast cancer. Preliminary results. European Journal of Cancer. Supplement. 01.09.2007, Vol. 5, N° 4, pages 116-117. ISSN 1359-6349 (the whole document).	6, 8, 10, 11, 16 y 18
X	Crombet T. et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. Journal of Clinical Oncology. 01.05.2004, Vol. 22, N° 9, pages 1646-1654 (the whole document).	6, 8, 10, 11, 16 y 17
X	Crombet T. et al. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3. Cancer Biology and Therapy. 04.2006, Vol. 5, N° 4, páginas 375-379 (the whole document).	6, 8, 10, 11, 16 y 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2009/000004

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: Claims 1-5, 7, 9, 12-15 and 19 and claims 6, 10 and 11 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The subject matter of claims 1-5, 7, 9, 12-15 and 19 does not meet the requirements of clarity and concision (PCT Article 6) to such an extent that it was not possible to carry out a meaningful search based on these claims. Claims 6, 10 and 11 (in part) lack the requisite clarity and concision (PCT Article 6). One of the reasons for this is that they contain a number of vague phrases and terms.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No. PCT/ CU 2009/000004
--

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008037225 A1	03.04.2008	CA 2664795 A	03.04.2008
		AU 2007302429 A	03.04.2008
		UY 30616 A	02.05.2008
		AR 063011 A	23.12.2008
		KR 20090058566 A	09.06.2009
		EP 2070547 A	17.06.2009
		EP 20070817381	27.09.2007
US 2002065398 A1	30.05.2002	CA 2332183 AC	19.05.1996
		CA 2163151 AC	19.05.1996
		EP 0712863 AB	22.05.1996
		EP 19950203126	15.11.1995
		CN 1130193 A	04.09.1996
		CN 1054609 C	19.07.2000
		JP 8291200 A	05.11.1996
		JP 3585303 B	04.11.2004
		US 5891996 A	06.04.1999
		AT 213744 T	15.03.2002
		US 6506883 B	14.01.2003
		DK 712863 T	17.06.2002
		PT 712863 E	30.08.2002
		ES 2173149 T	16.10.2002
		DE 69525593 T	31.10.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ CU 2009/000004

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ CU 2009/000004

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2002/0065398 A1 (Del Río et al.) 30.05.2002, párrafos [1-35]; párrafos [47-75]; párrafos [136-137]; reivindicaciones 1,9-12; reivindicaciones 15-24;	6, 8, 10, 11 y 16
X	TheraCIM. h-R3. Drugs of the Future. 2003, Vol. 28, N° 9, páginas 847-853. CCC: 0377-8282/2003 (todo el documento).	6, 8, 10, 11 y 16
X	Crombet-Ramos T. et al. Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: a humanized anti-EGFR antibody. Int. J. Cancer. 2002, Vol. 101, páginas 567-575. DOI: 10.1002/ijc.10647 (todo el documento).	6, 8, 10, 11 y 16
X	WO 2008/037225 A1 (CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR) 03.04.2008, (todo el documento).	6, 8, 10, 11, 16 y 18

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30 Septiembre 2009 (30.09.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 de OCTUBRE de 2009 (09/10/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Cumbreño Galindo

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono +34 91 349 68 80

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 2008)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ CU 2009/000004

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 1-5, 7, 9, 12-15 y 19 y a las reivindicaciones 6, 10 y 11 (parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 1-5, 7, 9, 12-15 y 19 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible. Las reivindicaciones 6, 10 y 11 (parcialmente) no son lo suficientemente claras y concisas como se exige en el Artículo 6 del PCT. Una de las razones es que incluyen numerosas frases y términos confusos.

3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 2009/000004

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	Soriano J. et al. Phase I clinical study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody (Nimotuzumab) in combination with chemotherapy in patients with locally-advanced breast cancer. Preliminary results. European Journal of Cancer. Supplement. 01.09.2007, Vol. 5, N° 4, páginas 116-117. ISSN 1359-6349 (todo el documento).	6, 8, 10, 11, 16 y 18
X	Crombet T. et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. Journal of Clinical Oncology. 01.05.2004, Vol. 22, N° 9, páginas 1646-1654 (todo el documento).	6, 8, 10, 11, 16 y 17
X	Crombet T. et al. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3. Cancer Biology and Therapy. 04.2006, Vol. 5, N° 4, páginas 375-379 (todo el documento).	6, 8, 10, 11, 16 y 17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU 2009/000004

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2008037225 A1	03.04.2008	CA 2664795 A	03.04.2008
		AU 2007302429 A	03.04.2008
		UY 30616 A	02.05.2008
		AR 063011 A	23.12.2008
		KR 20090058566 A	09.06.2009
		EP 2070547 A	17.06.2009
		EP 20070817381	27.09.2007
			27.09.2007
US 2002065398 A1	30.05.2002	CA 2332183 AC	19.05.1996
		CA 2163151 AC	19.05.1996
		EP 0712863 AB	22.05.1996
		EP 19950203126	15.11.1995
		CN 1130193 A	04.09.1996
		CN 1054609 C	19.07.2000
		JP 8291200 A	05.11.1996
		JP 3585303 B	04.11.2004
		US 5891996 A	06.04.1999
		AT 213744 T	15.03.2002
		US 6506883 B	14.01.2003
		DK 712863 T	17.06.2002
		PT 712863 E	30.08.2002
		ES 2173149 T	16.10.2002
		DE 69525593 T	31.10.2002

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) CON ACCIÓN CITOSTÁTICA Y SUS USOS EN LA
TERAPIA DE TUMORES**

Campo de la técnica:

5 La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, particularmente con la salud humana. Y más particularmente con nuevos anticuerpos que reconocen el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento Epidérmico (EGF-R) y que bloquean la unión del ligando natural pero sin inhibir completamente la dimerización de esta molécula.

10

Estado de la técnica anterior:

Los avances en el conocimiento de la biología de los tumores y los mecanismos de la oncogénesis han permitido identificar diferentes blancos para la terapia del cáncer, particularmente el cáncer de pulmón, que se sabe es una de las primeras
15 causas de muerte tanto de mujeres como de hombres. Entre estos blancos, el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), o HER 1 ha recibido particular atención para el tratamiento del cáncer de pulmón. El EGFR es un receptor transmembranario que se encuentra fundamentalmente en células de origen epitelial. La autofosforilación de su dominio intracelular desencadena o
20 inicia una cascada de eventos que conducen a la proliferación celular. El EGFR es comúnmente expresado a altos niveles en una variedad de tumores sólidos y para estos, se ha evidenciado que el EGFR está involucrado en el control de la supervivencia de las células, la proliferación, metástasis y angiogénesis.

La principal estrategia en el desarrollo de armas terapéuticas basadas en la
25 inhibición del EGFR han sido los anticuerpos monoclonales que sean antagonistas de los ligandos naturales del receptor, así como pequeñas moléculas que inhiben la actividad tirosina quinasa del dominio intracelular.

Específicamente contra el HER1 o EGFR existen actualmente varios anticuerpos cuya eficacia terapéutica está siendo evaluada en la clínica. Algunos de ellos son los anticuerpos Cetuximab, Panitumumab y Matuzumab entre otros.

Cetuximab (Erbitux), es un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce
5 específicamente el dominio extracelular del EGFR y que ha sido aprobado por la FDA para cáncer colo-rectal y tumores avanzados de cabeza y cuello. Resultados experimentales han demostrado que el Cetuximab es un potente inhibidor de la proliferación de las células A431 derivadas de un carcinoma epidermoide, tanto *in vitro* como en tumores trasplantados en ratones atímicos. También se ha
10 demostrado que tienen un efecto sinérgico importante cuando se combinan tanto con drogas citotóxicas como con radioterapia. Estos resultados han servido de base a la realización de ensayos clínicos. Los resultados de los Ensayos Clínicos Fase II han demostrado que el Cetuximab tanto solo como combinado con irinotecan and oxaliplatin tiene un efecto como terapia de primera línea para
15 pacientes avanzados con cáncer colo-rectal metastásico, habiéndose reportado un incremento absoluto de entre el 10 y el 20% de respuesta. Otro ensayo clínico Internacional Multicéntrico que incluyó 424 pacientes con enfermedad loco regional en estado avanzado, la combinación de Cetuximab con radioterapia prácticamente dobló el tiempo de sobrevida de los pacientes de 28 a 54 meses. A
20 la vez esta combinación incrementó el tiempo de sobrevida de los pacientes después de dos y tres años bajo tratamiento desde 55 y 44% respectivamente para los pacientes que recibieron radioterapia solamente hasta 62 y 57% para aquellos que recibieron la combinación. En general los resultados han mostrado que el uso del Cetuximab tanto cuando se administra como mono terapia o en
25 combinación con drogas citotóxicas o con radioterapia son altamente eficientes. Sin embargo, también se ha observado un significativo incremento de la toxicidad inducida por las terapias convencionales.

El Panitumumab que es un anticuerpo completamente humanizado que reconoce el EGFR y es otro anticuerpo monoclonal terapéutico aprobado por la FDA en 2006 como monoterapia para cáncer colo-rectal metastásico con progresión de la enfermedad después de ser sometidos a régimen de quimioterapia. Los resultados
5 del tratamiento con Panitumumab son básicamente similares a los obtenidos con Cetuximab, al igual que las reacciones adversas.

Se ha evaluado el efecto en la clínica de muchos antagonistas del EGFR, incluyendo diversos anticuerpos monoclonales. Sin embargo la respuesta objetiva obtenida con la mayoría de estas drogas anti-EGFR ha sido de corta duración y la
10 toxicidad común ha sido una severa erupción cutánea que en muchos casos conlleva a la interrupción del tratamiento.

Hasta el momento actual los diferentes ensayos en los que se evalúan drogas relacionadas con el EGFR han arrojado que existe una fuerte asociación entre la severidad de la erupción cutánea y la respuesta del tumor, lo cual sugiere que la
15 aparición de la erupción sirve como un marcador predictivo de la respuesta antitumoral de los agentes que tienen como blanco el EGFR. En otras palabras, la respuesta de los tumores está asociada al efecto de la droga sobre otros tejidos sanos no relacionados con el tumor, como puede ser la piel (Peedicayil J. y col., en Correspondence 2004, doi: 10.016).

20 Gridelli C. y col., en Results of an Experts Panel Meeting, Crit. Rev. Oncol/Hematol. 2007, doi: 10.1016, hace una revisión de los resultados de diversos ensayos clínicos en los que se encuentra una relación positiva entre la erupción cutánea y la respuesta al tratamiento y/o la sobrevida de los pacientes. En el artículo se concluye que cada vez con más fuerza se considera la reacción
25 cutánea como un marcador indirecto de que realmente el EGFR está siendo bloqueado por las drogas; por lo que hay casi un consenso entre los expertos de que la erupción cutánea es un importante marcador clínico subrogado de la

actividad anti tumoral o de eficacia terapéutica y se sugiere que la reacción cutánea podría servir para identificar el grupo de pacientes que más se beneficiarían con el tratamiento.

Sin embargo, resultados de ensayos clínicos utilizando el anticuerpo monoclonal anti-EGFR, hR3 (EP 0712863B1 y US 5,891,996), mostraron que el anticuerpo es bien tolerado por los pacientes. La erupción cutánea, que ha sido detectada en el 80% de los pacientes tratado con otras drogas bloqueadoras del EGFR (Perez-Soler y col en Oncologist 2005; 10: 345-56 y Thomas y col en Clin J. Oncol N 2005; 9: 332-8) no aparece en los pacientes sometidos a dosis repetitivas de hR3 (Crombet y col. en Cancer Biology & Therapy 5;4, 375-379, 2006).

A pesar del consenso que existe en el estado del arte sobre la asociación directa entre la erupción cutánea y el bloqueo del EGFR, los autores de la presente invención consideran que la erupción cutánea es una desventaja asociada a la droga y no al blanco de ahí la necesidad de continuar explorando nuevos agentes anti-EGFR.

Memoria descriptiva:

La presente invención se relaciona con los inhibidores del receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) con actividad citostática y no citotóxica sobre células que expresan dicho receptor.

Debe entenderse por agente Citostático cualquier agente que inhibe la proliferación celular deteniendo las células en una fase del ciclo celular; mientras que agente Citotóxico: es todo agente que induce muerte celular.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que entre los inhibidores del EGFR, o lo que es igual, aquellas moléculas que en su interacción con el receptor inhiben la señal mitogénica inducida por los ligandos naturales, hay un grupo que por el sitio en que reconocen al receptor, permiten un

equilibrio fisiológico entre las conformaciones activa e inactiva del receptor y por tanto mantienen un nivel basal de autofosforilación del receptor. Este nivel basal de autofosforilación del receptor hace que las células que lo expresan queden arrestadas en una fase del ciclo celular. La aplicación clínica de este resultado es

5 que permite el diseño de drogas antitumorales que mas que inducir la muerte de las células tumorales ejerzan un control biológico sobre el crecimiento del tumor. Adicionalmente, este tipo de droga antitumoral tiene la ventaja que no provoca los serios efectos adversos, como la erupción cutánea, que se ha reportado previamente para los inhibidores del EGFR que tienen efecto citotóxico sobre los

10 tumores.

Los inhibidores del EGFR con actividad citostática descritos en la presente invención se podrían caracterizar porque reconocen al EGFR por los dominios I o III de la región extracelular, preferiblemente por dominio III, e inhiben la unión del ligando natural y por tanto la señal mitogénica; aquellas moléculas que reconocen

15 al receptor por estos dominios pero que al mismo tiempo dejan libre el dominio II de la región extracelular del receptor de forma tal que este forme homodímeros que activen la fosforilación de la región intracelular de dichos receptores, resultan moléculas con actividad citostática sobre células que expresan el EGFR y por tanto potenciales agentes terapéuticos para tumores que expresan este receptor

20 de membrana.

Los autores de la presente invención también han descubierto que la terapia de tumores malignos con estas moléculas, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que inhiben la señal mitogénica del EGF pero que no impiden un nivel basal de autofosforilación tienen un efecto cistostático sobre el crecimiento

25 tumoral.

Las armas terapéuticas actuales que tienen como blanco el EGFR, tanto aquellas que resultan antagonistas de los ligandos mitogénicos, como las pequeñas

moléculas inhibidoras de la autofosforilación del receptor tienen una utilidad limitada por los efectos adversos que obliga en muchos casos a suspender el tratamiento. Los autores de la presente invención han encontrado moléculas que teniendo como blanco terapéutico el EGFR pueden simultáneamente inhibir el

5 crecimiento tumoral sin producir los severos efectos adversos descritos para los inhibidores de la autofosforilación del EGFR existentes hasta el momento. El hallazgo de la presente invención se basa en inhibir la actividad mitogénica inducida por los ligandos naturales del EGFR sin inhibir completamente la autofosforilación del EGFR. Ha sido descrito previamente que el EGFR se

10 encuentra en equilibrio en la membrana entre sus formas activa e inactiva. Cuando está en forma activa, el dominio II de la región extracelular interactúa con el mismo dominio de otras moléculas formando homodímeros y activando la autofosforilación del dominio intracelular, esta fosforilación desencadena una cascada de eventos vitales para las células. Se ha calculado que en ausencia de

15 ligandos mitogénicos, entre 5 y el 10% de los receptores se encuentran en forma activa y por tanto fosforilados, este nivel de fosforilación aunque no es mitogénico permite la supervivencia de las células. Según los autores de la presente invención, utilizar drogas que inhiban completamente la autofosforilación del receptor provocaría la muerte celular masiva, tanto las células tumorales como

20 tejidos normales sufrirán esta privación y de ahí los efectos adversos severos. Sin embargo con el empleo de los inhibidores que son objeto de la presente invención, se logra inhibir la actividad mitogénica sobre el crecimiento de los tumores pero se mantiene la fosforilación basal que permite la supervivencia de las células. El primer tipo de droga provocara un efecto citotóxico con regresiones

25 tumorales impresionantes pero se le asocian efectos adversos severos y recaídas tempranas. Las drogas objeto de la presente invención, más que una muerte celular masiva con regresiones espectaculares provocarían estabilizaciones de la

enfermedad por efecto citostático sobre los tumores sin grandes efectos adversos sobre tejidos normales.

Adicionalmente, los autores de la presente invención también han encontrado que estos inhibidores de EGFR con actividad citostática mantienen las propiedades como radio y quimio sensibilizadores descritas previamente para los inhibidores del EGFR con actividad citotóxica.

Basados en los hallazgos experimentales, los autores de la presente invención reclaman moléculas que tienen como blanco el EGFR y cuya actividad es el control biológico del crecimiento de los tumores. Tanto cuando son administrados como monoterapia como cuando se usan en combinación con quimio o radio terapia.

Por tanto son objeto de la presente invención aquellos ligandos del EGFR, naturales o sintéticos, preferiblemente naturales y más preferiblemente anticuerpos monoclonales, antagonistas del EGF que inhiben la unión del EGF al dominio extracelular del receptor pero que no interfieren en la dimerización del receptor y por tanto no afectan el nivel basal de autofosforilación.

Es también objeto de la presente invención un método para el tratamiento de un paciente de cáncer, que comprende la administración de una composición farmacéutica que contiene el ligando del EGFR, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, antagonista del EGF pero que no inhibe la autofosforilación basal del receptor.

También forma parte del objeto de la presente invención un método para el diseño y la selección de los ligandos, preferiblemente los anticuerpos monoclonales con acción citostática sobre el crecimiento de los tumores malignos.

25

Descripción detallada de la invención:

observó como la señal dada por el Fab-hR3 biotinilado, al ser revelado con esreptavidina conjugada a fosfatasa, disminuía.

También se realizaron ensayos de competencia utilizando el FACS sobre células A431, que se conoce que sobre expresan el EGFR. Aquí se hicieron diluciones de hR3/Cetuximab similares a las descritas anteriormente y se confirmó que el anticuerpo hR3 compite con el Cetuximab por la unión al receptor de EGF.

Los resultados obtenidos tanto por ELISA como por FACS indican que los epitopos reconocidos por ambos anticuerpos están muy cercanos y no es posible que ambos se unan simultáneamente al receptor. Basándose en estos resultados y conociendo del arte previo que Cetuximab se une al EGFR por el dominio III de la región extracelular del receptor, es posible asumir que el hR3 se une al EGFR por el mismo Dominio que el Cetuximab.

Ejemplo 3: Modelo del complejo anticuerpo-receptor.

El modelo del complejo entre hR3 y el EGFR se predijo mediante cálculos “*in silico*”. Para esto se usaron, de forma secuencial, el programa RosettaDock, para la predicción del acoplamiento de ambas proteínas y Posteriormente se usó el programa NAMD para relajar la estructura del complejo dentro de una caja de agua.

El resultado de este modelo se observa en la Figura 1. El panel A) muestra una vista general del modelo con el EGFR en su conformación de baja afinidad de unión al ligando (inactiva). En el panel B) se observa igualmente una vista general del modelo pero en este caso el EGFR está en su conformación de alta afinidad por el ligando (activa). De esta figura se observa que según nuestro modelo hR3 es capaz de unirse al EGFR sin inhibir el cambio de conformación que este necesita para la dimerización y la posterior señalización. El panel C) muestra un acercamiento a las interacciones moleculares entre el hR3 y el EGFR.

En la Figura 2A se muestra como, según nuestro modelo, inhibe la unión del Cetuximab. Mientras en la Figura 2B, se muestra como el anticuerpo hR3 bloquea la unión del ligando EGF a su receptor el EGFR.

5 **Ejemplo 4: Modelo teórico de un fragmento Fv de un anticuerpo que se une al dominio I del EGFR.** El modelo se obtuvo por la misma metodología que el modelo del ejemplo 3. El anticuerpo unido permite que el receptor adopte la conformación activa donde los dominios I y II están próximos uno al otro. El EGF (Figura 3, en rojo, representado en modelo de Dreiding), en cambio, no puede
10 colocarse en su sitio de unión debido a impedimentos estéricos causados por el anticuerpo (el solapamiento de ambas estructuras es claramente visible en la Figura 3. La estructura del EGFR en complejo con el EGF fue tomada del fichero con código 1ivo del Protein Data Bank. El fragmento Fv de anticuerpo fue construido por modelación computacional.

15

Ejemplo 5: Efecto citotóxico de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR sobre las células tumorales A431 y H125.

Las células A431 y H125 (2×10^5) se sembraron en placas de 24 pozos usando medio DMEN:F12 al 10% SFT. Doce horas después las células se tratan con los
20 anticuerpos monoclonales Cetuximab (7-175 nM) o Nimotuzumab (70-1750 nM) en medio DMEN:F12 con 1% de SFT y EGF humano (500 pg/ml) y se incubaron 48 horas. Este tratamiento se repitió durante otras 48 horas. La muerte celular se analizó después de 96 horas de tratamiento mediante citometría de flujo utilizando un marcaje con yoduro de propidio (10 μ g/ml). Las células no tratadas se
25 incluyeron como control de mínima muerte. En las dos líneas celulares analizadas, el Cetuximab induce mayor porcentaje de células muertas a todas las concentraciones ensayadas que el anticuerpo Nimotuzumab (Figura 4). Es de

resaltar que este resultado se obtiene aun cuando el Nimotuzumab es usado 10X de concentración con respecto al Cetuximab, para independizar las diferencias en efecto citotóxico de las diferencias en afinidad de ambos anticuerpos.

5 **Ejemplo 6: Efecto citotóxico versus citostático de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR sobre las células tumorales A431 y H125.**

Las células A431 y H125 (0.25×10^6) se sembraron en placas de 6 pozos usando medio DMEN:F12 al 10% SFT. Doce horas después las células se tratan con los anticuerpos monoclonales Cetuximab o Nimotuzumab (7-1750 nM) o con el
10 AG1478 (inhibidor tirosina cinasa del EGFR) a $10 \mu\text{M}$ en medio DMEN:F12 con 1% de SFT y EGF humano (500 pg/ml) y se incubaron 48 horas. Este tratamiento se repitió durante otras 48 horas. Para analizar el ciclo celular y la fragmentación del ADN (marcador de apoptosis tardía) en estas líneas después de las 96 horas de tratamiento, las células se fijaron con una mezcla de metanol:acetona (4:1) a 4°C y
15 se marcaron incubando con ioduro de propidio ($400 \mu\text{g/ml}$) y RNAsa ($100 \mu\text{g/ml}$). Ambos análisis se realizaron en un citómetro de flujo, colectando como mínimo 20 000 eventos y los datos se procesaron usando los programas WinMDI 2.8 y ModFit3.0.

Como se puede observar en las Figura 5, tanto en las células A431 (A) como en
20 las H125 (B) ambos anticuerpos monoclonales (Cetuximab: 175 nM, Nimotuzumab: 1750 nM) inducen un similar incremento en la fracción de las células en la fase G0-G1 con la correspondiente disminución de las células en las fases G2-M y S al compararse con las células sin tratamiento. Este efecto fue comparable al obtenido con el AG1478 usado como control positivo de detención
25 del ciclo celular. En las tablas 1 (A431) y 2 (H125) se muestran los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo para un amplio rango de concentraciones de Nimotuzumab y Cetuximab que se emplearon para hacer el experimento.

Sin embargo, cuando se analiza la capacidad de estos anticuerpos de inducir apoptosis sobre estas células, se observa que aun cuando ambos son capaces de tener un semejante efecto anti-proliferativo sobre las células A431 y H125, el Cetuximab induce a todas las concentraciones empleadas un mayor porcentaje de células apoptóticas que el Nimotuzumab (Figura 5, Tabla 2, Tabla 3).

Fases del ciclo celular (%)	Sin tratamiento	Cetuximab (nM)				
		7	35	70	140	175
G ₀ /G ₁	46.21	56.57	58.08	62.19	64.87	70.89
G2/M	8.89	8.01	8.04	7.46	6.09	5.03
S	44.90	35.42	33.88	30.35	29.04	24.08
Células apoptóticas(%)	3.50	3.96	10.78	19.67	25.45	31.19

Fases del ciclo celular (%)	AG1478 10 µM	Nimotuzumab (nM)				
		70	350	700	1400	1750
G ₀ /G ₁	79.82	56.08	58.98	60.32	64.68	70.01
G2/M	3.11	8.12	7.87	7.98	6.21	5.12
S	17.06	35.08	33.17	31.7	29.11	24.87
Células apoptóticas(%)	42.75	3.62	3.94	4.07	4.65	5.50

Tabla 2. Distribución del ciclo celular y porcentaje de células apoptóticas de la línea A431 tratada con diferentes concentraciones de Cetuximab y Nimotuzumab.

Fases del ciclo celular (%)	Sin tratamiento	Cetuximab (nM)				
		7	35	70	140	175
G ₀ /G ₁	50.68	51.41	55.22	57.69	60.69	69.46
G2/M	10.25	10.02	9.56	9.34	9.22	9.05
S	39.07	38.57	35.22	33.27	30.09	21.54
Células apoptóticas (%)	7.18	10.35	16.62	20.15	23.59	25.48

Faese del ciclo celular (%)	AG1478 10 µM	Nimotuzumab (nM)				
		70	350	700	1400	1750
G ₀ /G ₁	74.55	53.89	54.63	55.52	58.34	68.55
G2/M	8.79	11.45	9.89	9.68	9.46	9.28
S	16.66	34.66	35.48	34.80	32.20	22.17
Células apoptóticas (%)	31.67	7.24	8.30	10.63	11.40	13.67

Tabla 3. Distribución del ciclo celular y porcentaje de células apoptóticas de la línea H125 tratada con diferentes concentraciones de Cetuximab y Nimotuzumab.

Ejemplo 7: Actividad antitumoral en ratones atímicos xenotrasplantados.

Los animales utilizados para la experimentación fueron ratones atímicos NMRI (8-10 semanas) los cuales se obtuvieron de Charles River (Sulzfeld, Alemania). Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas en un animalario aprobado en el cuidado de animales de laboratorio y acorde a las regulaciones y normas vigentes, y su uso fue aprobado por las autoridades responsables locales.

Para producir los tumores, las células se tomaron de cultivos subconfluentes por tratamiento con tripsina 0.25% y EDTA 0.05%. La trypsinización se detuvo con medio al 10% de suero fetal de ternera. Para la inoculación solo se emplearon aquellas suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 90%. Se inocularon 8 animales por grupo con 10^7 células de la línea U87MG por vía subcutánea en el flanco izquierdo y con 2×10^4 U87MG por vía intracraneal en el hemisferio derecho del cerebro de los ratones con la ayuda de un dispositivo estereotáctico. El peso corporal de los ratones se monitoreó durante toda la experimentación. La talla de los tumores subcutáneos se midió tres veces por semana y el volumen tumoral se determinó mediante la fórmula: $0.5 \times (\text{diámetro mayor}) \times (\text{diámetro menor})^2$. Los índices de volumen tumoral relativos (RTV) se calcularon referidos a los volúmenes medios de cada día respecto a la primera medición (ajustado a 1). Los animales se sacrificaron cuando el peso de los tumores excedió el 10% del peso total de los animales. La talla de los tumores intracraneales también se determinó. Para ese propósito se extrajeron los cerebros completos de los animales y se congelaron en 2-metil butano. Se realizaron cortes en criostato (10 μ m) y se tomaron secciones consecutivas y se tiñeron con violeta cresil. Se determinaron los diámetros mayores de los tumores y los perímetros con la ayuda de un microscopio (Zeiss Axioskop), y se calcularon los volúmenes tumorales. Los tumores subcutáneos se congelaron y se almacenaron a -80°C para otros análisis. Los diferentes tratamientos se iniciaron tres días después de inoculados

los tumores. Los animales se trataron tres veces por semana con los anticuerpos monoclonales Nimotuzumab o Cetuximab con 50 mg/kg/dosis mediante administración intraperitoneal. En los grupos que recibieron irradiación, los animales se expusieron a una dosis total de 3.0 Gy de irradiación de cuerpo completo (TBI), fraccionado en 1.0 Gy semanal durante tres semanas comenzando 72 horas después de la inoculación de los tumores. Además se trataron grupos de animales con la combinación de los anticuerpos más la radioterapia. En estos grupos los anticuerpos se administraron 6 horas antes de la terapia de radiación. En el experimento se incluyó un grupo adicional de 10 animales que recibió solución salina en lugar de anticuerpos y se tomó como control. Figura 6 muestra la sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada por vía subcutánea en ratones NMRI atímicos por anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a 50 mg/kg/dosis tres veces por semana durante tres semanas. Los animales tratados con radioterapia recibieron una dosis total de 3 Gy fraccionada en 1 Gy semanal durante tres semanas. En la figura se muestran las administraciones de los anticuerpos en flechas negras continuas y la radiación en flechas fraccionadas. Los volúmenes tumorales se determinaron en los tiempos indicados. La adición de los anticuerpos a la radioterapia retardó significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de los tumores en los ratones respecto a los grupos de animales tratados con radioterapia o no tratados. La adición del Nimotuzumab a la radioterapia también retardó significativamente el crecimiento de los tumores respecto al grupo tratado con el anticuerpo solamente. Prueba estadística de Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias estadísticas respecto a (*) PBS, (+) anticuerpo solo, (°) radioterapia.

Figura 7 muestra la sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada ortotópicamente en ratones NMRI atímicos a la radioterapia por

anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Todos los tratamientos comenzaron tres días después de la inoculación de los tumores con Nimotuzumab, Cetuximab, radioterapia, Nimotuzumab más radioterapia, Cetuximab más radioterapia o PBS. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a 50 mg/kg/dosis tres veces por semana durante tres semanas. Los animales tratados con radioterapia recibieron una dosis total de 3 Gy fraccionada en 1 Gy semanal durante tres semanas. Las secciones de cerebro analizadas en los grupos que recibieron los anticuerpos más la radioterapia mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en el tamaño de los tumores. La adición del Nimotuzumab a la radioterapia disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el tamaño de los tumores respecto a la radioterapia sola. Prueba estadística de Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias significativas respecto a: (*) PBS, (+) radioterapia.

Angiogenesis (CD31/PECAM-1). Las muestras de tumores se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se fijaron en para-formaldehído 3.7% durante 15 minutos. Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0.03% (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) durante 15 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario anti CD31/PECAM-1 a temperatura ambiente por 2 horas a una dilución de 1:100 en medio diluyente de anticuerpo (DAKO Corporation, Carpinteria, CA). Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa a temperatura ambiente durante 30 minutos para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. Finalmente se visualizaron las secciones con el cromógeno DAB (DAKO Corporation, Carpinteria, CA), se montaron las láminas y se analizó la tinción con CD31. Las secciones tumorales representativas se visualizaron en un microscopio de luz (Zeiss, Axioskop) con una magnificación ocular de X40. Se estimó el área de los micro-vasos sanguíneos endoteliales presentes en los tumores de 5

campos microscópicos en cada tumor, y se promedió el valor medio en cada caso. El área total de los vasos evaluados se calculó empleando el programa Axio Vision 4.5 (Zeiss). El tratamiento con Nimotuzumab estuvo asociado a una significativa reducción ($p < 0.01$) en el área de los vasos de los animales tratados (Figura 8).

5 **CD133.** Para la determinación de la expresión de CD133 las muestras tumorales se fijaron en acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las muestras en peróxido de hidrógeno 0.03% (DAKO Corporation, Carpinteria CA) durante 30 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero fetal de ternera al 20% durante 20
10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-CD133/1 AC133 (Milttenyi Biotec) durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de trabajo de 1:10 en diluyente de anticuerpo. Posteriormente se lavaron las muestras y se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se
15 visualizaron las secciones con el cromógeno DAB (DAKO Corporation, Carpinteria, CA), se montaron las láminas y se analizó la tinción con CD133. Las secciones tumorales representativas se visualizaron en un microscopio de luz (Olympus, Japan) con una magnificación ocular de X40. El porcentaje de células positivas al CD133 se determinó promediando el número de células positivas al marcador para
20 cada grupo analizado en las secciones correspondientes a los 5 campos donde se observó la mayor tinción. Figura 9 muestra el análisis inmunohistoquímico de la expresión del CD31 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados. El tratamiento con Nimotuzumab estuvo asociado a una significativa reducción ($p < 0.05$) en el porcentaje de células CD133 positivas
25 respecto a los animales tratados con radioterapia. La adición del Nimotuzumab a la radioterapia disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de células CD133 positivas respecto a los animales tratados con radioterapia y respecto a los

animales no tratados. Prueba estadística de Mann-Whitney; los símbolos indican diferencias significativas respecto a: (*) PBS, (+) radioterapia.

Análisis Estadístico. Las medias, desviaciones estándar, y el error estándar de la media se calcularon utilizando el programa GraphPAD versión 4.0 (GraphPAD, San Diego, C.A.). El análisis estadístico se realizó con el mismo programa GraphPAD InStat. La significación estadística entre grupos se comparó utilizando la prueba de Mann-Whitney, y la prueba de comparación Múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$.

Ejemplo 8: Efecto antitumoral de la combinación del Anticuerpo monoclonal hR3 (Nimotuzumab) y Carboplatino a bajas dosis. Los animales utilizados para la experimentación fueron ratones atímicos NMRI (8-10 semanas) retados por vía subcutánea con un tumor de origen humano clasificado como NSCLC. El día 0 del experimento los animales fueron inoculados con fragmentos del tumor. Cuando los tumores fueron palpables (entro los 10 y 12 días post-inoculación del tumor) los animales fueron tratados con 50 mg/Kg del anticuerpo monoclonal hR3 tres veces por semana y/o una dosis semanal de Carboplatino a 50 mg/Kg durante 6 semanas por vía intraperitoneal. Se usó PBS como control del experimento. El diámetro tumoral mayor y menor de los tumores fueron medidos 2 veces por semana y el volumen tumoral calculado por la siguiente fórmula: $VT = (\text{diámetro menor})^2 \times \text{diámetro mayor} / 0.52$. El Volumen Tumoral Relativo fue calculado de la siguiente manera: $VT \times 1 / VT_{\text{día0}}$. En la gráfica se representa el volumen tumoral relativo con el error estándar de la media. Figura 10.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Vista general del modelo (representado n modelo de cintas, eEGFR en azul, VL y VH en carmelita y verde respectivamente. A) EGFR en su conformación

de inactiva (baja afinidad) y B) EGFR en su conformación activa (alta afinidad). C) acercamiento a la interfase de interacción entre el Nimotuzumab y el EGFR.

Figura 2: Inhibición de la unión del Cetuximab A) y EGF, B) por el Nimotuzumab.

5 En A) Utilizando la representación de cintas se muestra el Cetuximab y por cintas y superficie está representado el Nimotuzumab (VL y VH de carmelita y verde respectivamente) y el EGFR en su conformación inactiva en azul. En B) se muestra el EGF como representación de cintas y superficie en color rojo.

10 **Figura 3:** Modelo teórico de un fragmento Fv de anticuerpo (en verde, representado en modelo de cintas) que se une al dominio I del EGFR.

Figure 4. Cetuximab tiene una mayor capacidad citotóxica que Nimotuzumab en las células A431 y H125. Las células A431 y H125 se trataron con los anticuerpos
15 cetuximab (7-175 nM) o Nimotuzumab (70-1750 nM) durante 96 horas y posteriormente se tiñeron con IP analizándose por FACS. Cada barra representa la media del porciento de células muertas a partir de células totales $\pm$ D.E de 3 pozos de tratamiento. Estos experimentos se repitieron tres veces obteniéndose resultados similares.

20

Figure 5. Nimotuzumab y Cetuximab tienen un similar efecto citostático sobre las células A431 y H125 mientras Cetuximab induce una mayor respuesta apoptótica que el Nimotuzumab sobre estas células. Las células A431 (A) y H125 (B) se trataron con los anticuerpos cetuximab (175 nM), nimotuzumab (1750 nM) o el
25 AG1478 (10 μ M) durante 96 horas y posteriormente se tiñeron con IP analizándose por FACS. En cada gráfico se muestran dos regiones. La de línea discontinua corresponde a las células vivas y para las mismas se muestra el

porcentaje de células en cada fase del ciclo. La de línea continua corresponde a las células apoptóticas y el porcentaje de las mismas con respecto al total también se muestra. Estos experimentos se repitieron tres veces obteniéndose resultados similares.

5

Figura 6: Sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada por vía subcutánea en ratones NMRI atímicos por anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Todos los tratamientos comenzaron tres días después de la inoculación de los tumores con ○ Nimotuzumab (h-R3), Δ Cetuximab (C225), ■ radioterapia (RT),
10 ● Nimotuzumab más radioterapia (h-R3 + RT), ▲ Cetuximab más radioterapia (C225 + RT) □ PBS como control (PBS).

Figura 7: Sensibilización de la línea tumoral humana U87MG xenotrasplantada ortotópicamente en ratones NMRI atímicos a la radioterapia por anticuerpos
15 monoclonales anti-EGFR.

Figura 8: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CD31 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados con Nimotuzumab (h-R3), Cetuximab (C225), radioterapia (RT), Nimotuzumab más
20 radioterapia (h-R3 + RT), C225 más radioterapia (C225 + RT), o PBS.

Figura 9: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CD133 en los tumores humanos de U87MG xenotrasplantados en ratones NMRI atímicos tratados con Nimotuzumab (h-R3), radioterapia (RT), Nimotuzumab más radioterapia (h-R3 +
25 RT), o PBS.

Figura 10: Efecto antitumoral de la combinación del Anticuerpo monoclonal hR3 (Nimotuzumab) y Carboplatino a bajas dosis. Animales atímicos retados con un tumor de origen humano clasificado como NSCLC, fueron tratados con 3 dosis diarias de 50 mg/Kg del anticuerpo hR3 y una dosis semanal de Carboplatino a 50 mg/Kg durante 6 semanas. En la gráfica se representa el volumen tumoral relativo con el error estándar de la media.

10

15

20

Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
CIM

**INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) CON ACCIÓN CITOSTÁTICA Y SUS USOS EN LA
TERAPIA DE TUMORES
REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) caracterizado porque dicho inhibidor reconoce al EGFR por los dominios I o III de la región extracelular inhibiendo la unión de los ligandos mitogénicos, adicionalmente permite que el dominio II de la región extracelular del receptor forme homodímeros que activen la autofosforilación de modo tal que dicho
- 10 inhibidor tiene una actividad citostática sobre células que expresan el receptor.
2. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio I de la región extracelular.
- 15 3. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio III de la región extracelular.
- 20 4. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.
- 25 5. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 4 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal humanizado o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.

6. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho inhibidor es al anticuerpo humanizado hR3 producido por el hibridoma secretor con numero de Deposito ECACC 951110101, o sus fragmentos con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.
7. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 4.
8. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 6 con numero de Deposito ECACC 951110101.
9. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los inhibidores de las reivindicaciones 1 a 3, y que adicionalmente puede contener excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente activos.
10. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos del anticuerpo de las reivindicaciones 4 a 6, y que adicionalmente puede contener excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente activos.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, caracterizada porque comprende el anticuerpo humanizado o los fragmentos del anticuerpo producido por el hibridoma secretor con numero de Deposito ECACC 951110101, o alguna de sus variantes o fragmentos con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.

12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo humanizado o los fragmentos del anticuerpo de la reivindicación 6.
13. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 para la terapia de tumores malignos.
- 5 14. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
- 10 15. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
16. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 para la terapia de tumores malignos.
- 15 17. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 en combinación con radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
18. Uso del inhibidor de la reivindicación 6 en combinación con quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
- 20 19. Un método para la selección de los inhibidores de la reivindicación 1.

25 Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

CIM

**INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) CON ACCIÓN CITOSTÁTICA Y SUS USOS EN LA
TERAPIA DE TUMORES**

RESUMEN

5 La presente invención se relaciona con inhibidores del receptor del Factor de
Crecimiento Epidérmico (EGFR) que se unen al receptor por los dominios I o III
bloqueando la unión de los ligandos naturales pero que permiten el equilibrio
fisiológico entre las conformaciones inactiva y activa del receptor de tal forma que
impiden la señal mitogénica pero la fracción del dominio II de los receptores que
10 están en conformación activa homodimerizan y autofosforilan al receptor
desencadenando la cadena de eventos bioquímicos que mantienen la
supervivencia de las células. Los autores de esta invención han encontrado que
estos inhibidores que reconocen el EGFR por los dominios I o III tienen un efecto
citostático y no citotóxico sobre tumores que expresan dicho receptor y
15 representan una ventaja sobre el estado del arte porque los efectos adversos que
provocan son menores que los reportados.

20

Josefa Lombardero Valladares

25 Representante Legal

CIM

Figuras:

1/6

Figura1

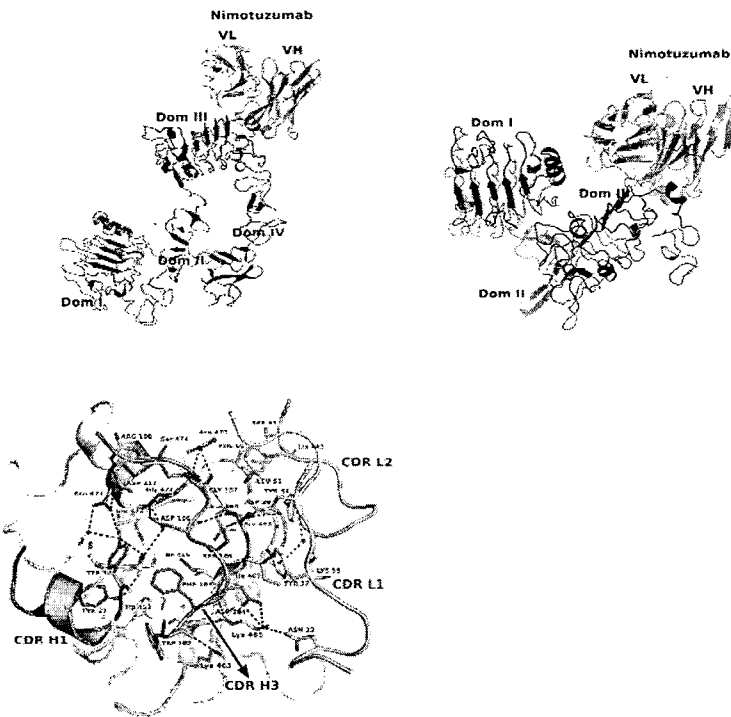
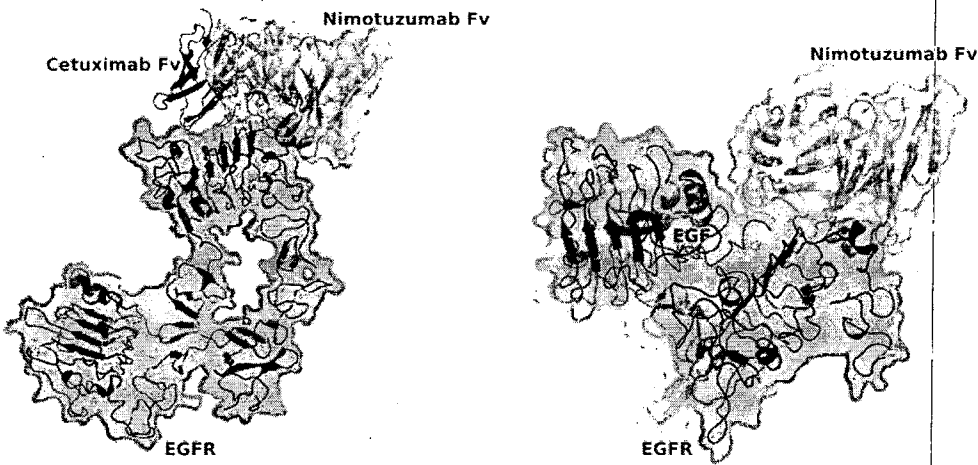
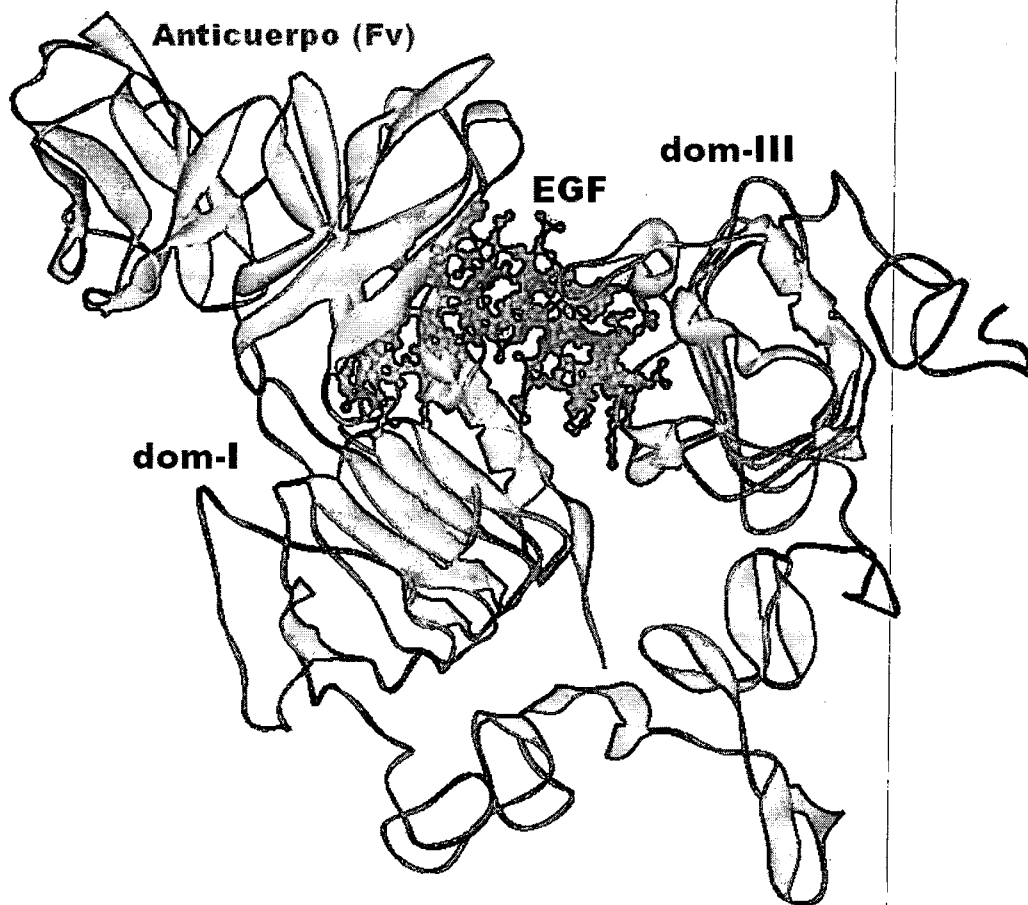


Figura 2





3/6

Figura 4

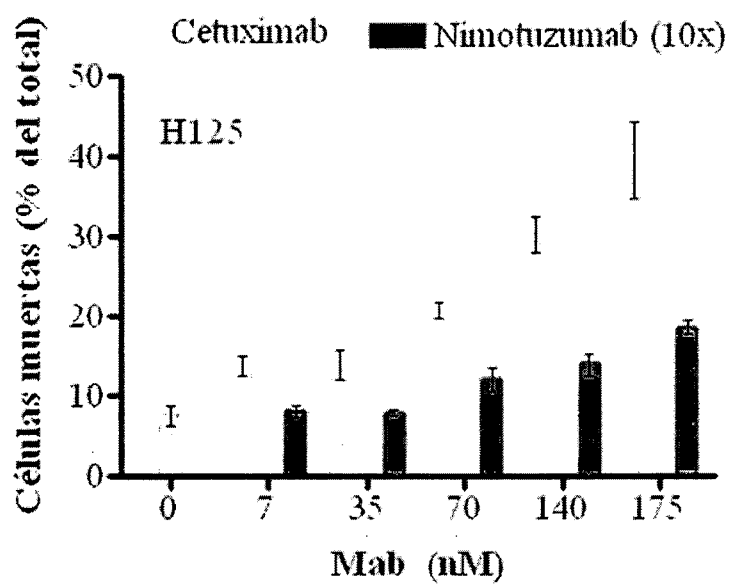
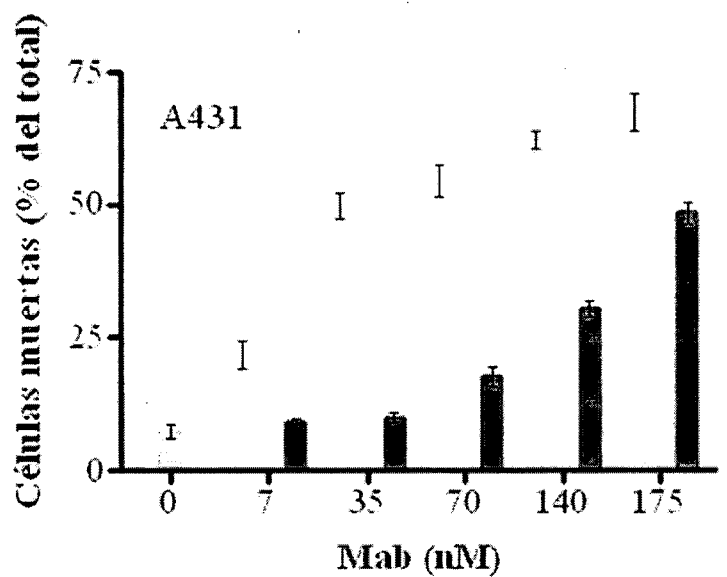


Figura 5

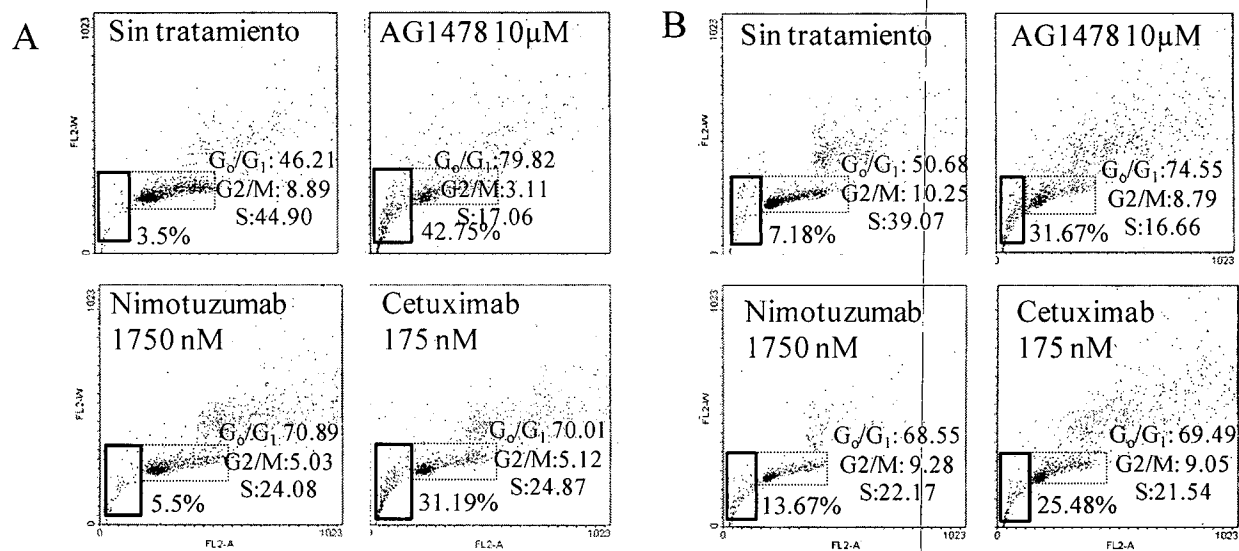


Figura 6

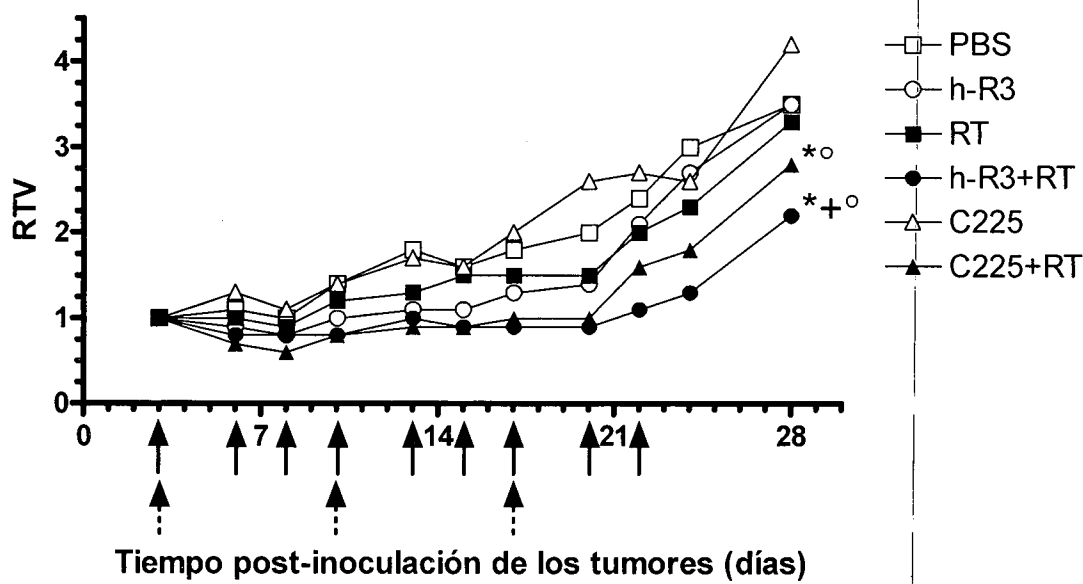


Figura 7

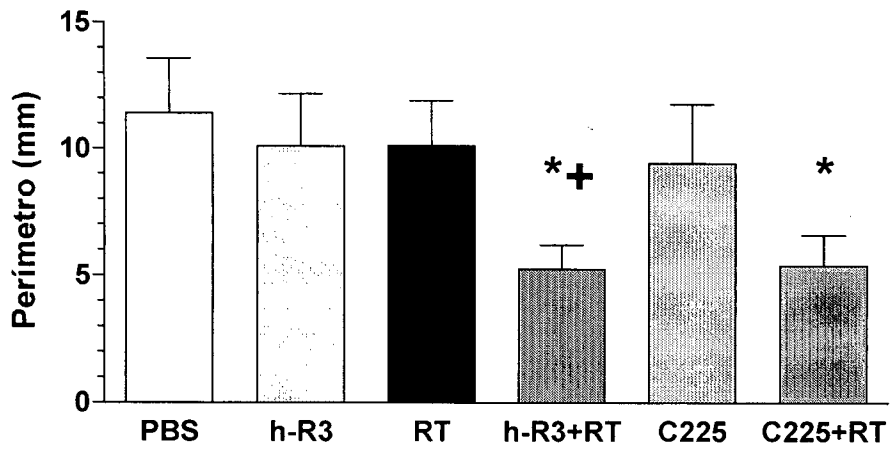


Figura 8

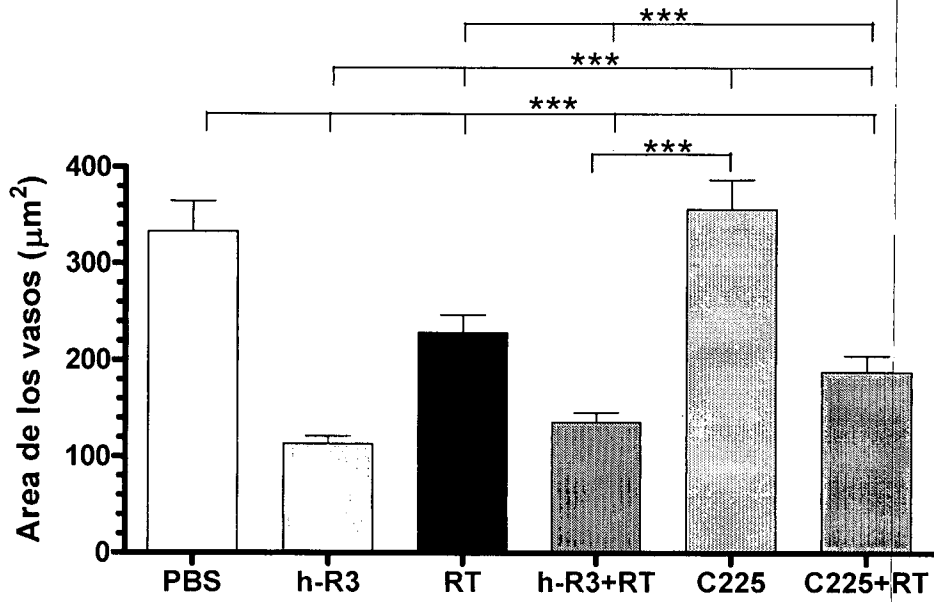


Figura 9

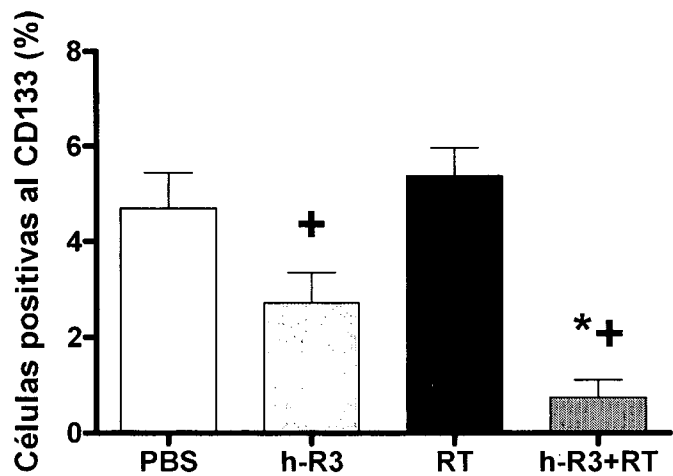
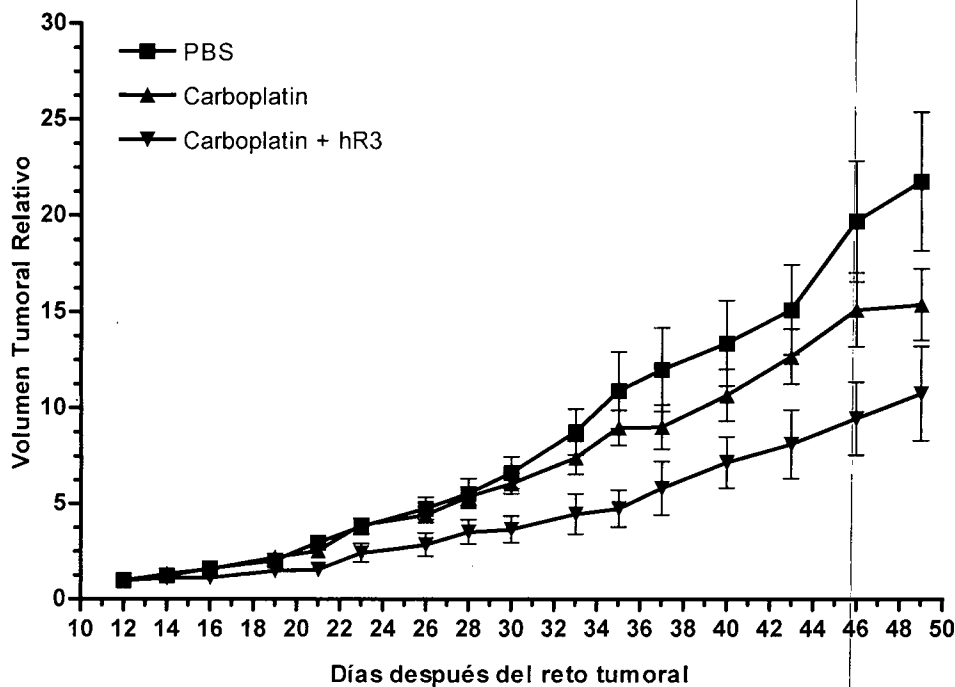


Figura 10





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

(72) Inventor(es) **ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ, GRETA GARRIDO HIDALGO, ERNESTO MORENO FRIAS, JOSE ENRIQUE MONTERO CASIMIRO, ARIEL TALAVERA PEREZ, ARLHEE DIAZ MIQUELI, YILDIAN DIAZ RODRIGUEZ**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

(31)

**No. Prioridad
2008-0117**

(32)

**Fecha
20/06/2008**

(33)

**País
CU**

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **22/06/2009**

No. de solicitud **PCT/CU2009/000004**

(87)

Publicación internacional

Fecha: **23/12/2009**

N° publicación: **WO 2009/152783 A1**

(54) Título: **INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR) CON ACCION CITOSTATICA Y SUS USOS EN LA TERAPIA DE TUMORES**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) País 2008-0117 20/06/2008 CU		(51) Int. Cl.: (71) Solicitante(s) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (72) Inventor(es) ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ GRETA GARRIDO HIDALGO ERNESTO MORENO FRIAS Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 22/06/2009 N° de solicitud PCT/CU2009/000004		(87) Publicación internacional Fecha: 23/12/2009 N° publicación: WO 2009/152783 A1	
(54) Titulo: INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR) CON ACCION CITOSTATICA Y SUS USOS EN LA TERAPIA DE TUMORES			

Reivindicación(es):

1. Un inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) caracterizado porque dicho inhibidor reconoce al EGFR por los dominios I o III de la región extracelular inhibiendo la unión de los ligandos mitogénicos, adicionalmente permite que el dominio II de la región extracelular del receptor forme homodimeros que activen la autofosforilación de modo tal que dicho inhibidor tiene una actividad citostática sobre células que expresan el receptor.
2. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio I de la región extracelular.
3. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1, caracterizado porque reconoce al EGFR por el dominio III de la región extracelular.
4. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 1 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.
5. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 4 caracterizado porque dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal humanizado o sus fragmentos contra el receptor del EGFR.
6. El inhibidor del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho inhibidor es al anticuerpo humanizado hR3 producido por el hibridoma secretor con numero de Deposito ECACC 951110101, o sus fragmentos con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.
7. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 4.
8. La línea celular secretora del anticuerpo de la reivindicación 6 con numero de Deposito ECACC 951110101.
9. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los inhibidores de las reivindicaciones 1 a 3, y que adicionalmente puede contener excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente activos.
10. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento de los tumores malignos que expresan EGFR caracterizada porque comprende al menos uno de los anticuerpos o fragmentos del anticuerpo de las

- reivindicaciones 4 a 6, y que adicionalmente puede contener excipientes y/o adyuvantes y/o otros ingredientes farmacéuticamente activos.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, caracterizada porque comprende el anticuerpo humanizado o los fragmentos del anticuerpo producido por el hibridoma secretor con numero de Deposito ECACC 951110101, o alguna de sus variantes o fragmentos con la misma actividad biológica que el anticuerpo original.
 12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo humanizado o los fragmentos del anticuerpo de la reivindicación 6.
 13. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 para la terapia de tumores malignos.
 14. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
 15. Uso del inhibidor de la reivindicación 1 en combinación con quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
 16. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 para la terapia de tumores malignos.
 17. Uso del anticuerpo de la reivindicación 6 en combinación con radioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
 18. Uso del inhibidor de la reivindicación 6 en combinación con quimioterapia para el tratamiento de tumores malignos.
 19. Un método para la selección de los inhibidores de la reivindicación 1.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-159623- -00000-0000 AI Fecha: 2010-12-20 14:43:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 85	
PATENTE DE INVENCION ☐		MODELO DE UTILIDAD ☐ Art. 33 Decisión 486/00	
☐	Indicación que se solicita una patente		
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☐	Descripción de la invención		
☐	Dibujos de ser estos pertinentes		
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)		
Completa ☐		Incompleta ☐	
PATENTE DE INVENCION PCT ☒		MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art. 33 Decisión 486/00 Circular Única	
☒	Indicación que se solicita una PCT		
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)		
☐	Dibujos de ser estos pertinentes		
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)		
Completa ☒		Incompleta ☐	
DISEÑO INDUSTRIAL ☐		(Art. 119 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita diseño industrial		
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño		
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas		
Completa ☐		Incompleta ☐	
ESQUEMA DE TRAZADO ☐		(Art. 92 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado		
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado		
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas		
Completa ☐		Incompleta ☐	



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

REFERENCIA	Radicación No.	10 159623
	Solicitud internacional	PCT/CU2009/000004
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	03380

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

25 FEB. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11